

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Isolation definierter Zellgruppen der Spermatogenese  
mithilfe von Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES  
2013

vorgelegt von Herrn Thomas Jähn  
geboren am 13.08.1980 in Leverkusen

*Meiner Familie*

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität des Saarlandes am

---

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Referent: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Gunther Wennemuth

1. Koreferent:

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Zusammenfassung</b>	1
<b>Summary</b>	3
<b>2. Einleitung</b>	5
2.1. Hoden und Spermatogenese	5
2.2. ABC-Transporter	6
2.2.1. ABC-Transporter	7
2.2.2. ABCG2 (BCRP, ABCP, MXR)	8
2.3. Hoechst 33342 und das SP-Phänomen	9
2.3.1. Vitalfarbstoff Hoechst 33342	9
2.3.2. SP-Phänomen	10
2.3.3. Hodenzellen im Hoechst-Profil	11
2.4. Zellstadien-abhängige Proteinexpression während der Spermatogenese	11
2.4.1. ABCG2-Expression	12
2.4.2. c-Kit Expression	13
2.4.3. CREM- $\tau$ Expression	13
2.4.4. CatSper Expression	14
2.4.5. Actb-Expression	15
2.5. Separationstechniken	15
2.5.1. Sedimentation	15
2.5.2. Durchflusszytometrie	16
2.6. Unterscheidung der Hodenzellen	17
2.7. Testikuläre Stammzelle und SP-Region	17
2.7.1. Spermatogonien A im Hoechst-Profil	18
2.7.2. Spermatogonien B und Spermatozyten I und II im Hoechst-Profil	19
2.7.3. Spermatisden im Hoechst-Profil	19
2.8. Fragestellung	20
<b>3. Materialien und Methoden</b>	22
3.1. Materialien	22
3.1.1. Allgemeine Geräte	22
3.1.2. Computerprogramme	22
3.1.3. Chemikalien und Reagenzien	23
3.1.4. Puffer und Lösungen	25
3.1.5. Fluorochrome	26

3.1.6. Primer	26
3.2. Methoden	27
3.2.1. Versuchsaufbau	27
3.2.2. Allgemeine Vorbemerkung	29
3.2.3. Beschreibung allgemeiner Arbeitsabläufe	29
3.2.4. Tierpräparation	30
3.2.5. Hodenaufbereitung	31
3.2.6. Knochenmarkpräparation	31
3.2.7. Erythrozytenlyse	31
3.2.8. Hoechst 33342-Färbung	32
3.2.9. Markierung von Oberflächenantigenen mit Antikörpern	32
3.2.10. Allgemeine Grundlagen der Durchflusszytometrie	35
3.2.11. Darstellung der Messergebnisse	36
3.2.12. Fluoreszenzgesteuerte Zellsortierung	37
3.2.13. FACS (-Messung)	38
3.2.14. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	39
3.2.15. Übersicht zur angewandten Methodik und Versuchsablauf	43
<b>4. Ergebnisse</b>	45
4.1. Hodenzellpopulationen	45
4.2. Zellanreicherung	46
4.2.1. Thy-1 Zellanreicherung mittels MACS	47
4.2.2. $\alpha$ -6-integrin Zellanreicherung mittels MACS	49
4.2.3. c-Kit Zellanreicherung mittels MACS	51
4.3. Fraktionierungsprotokoll für Hodenzellpopulationen	52
4.3.1. FACS-Sortierparameter für testikuläre SP-Zellen	53
4.3.2. FACS-Sortierparameter von Zellen der Gruppe 1 (Spermatogonien A)	56
4.3.3. FACS-Sortierparameter von Zellen der Gruppe 2 (Spermatogonien B)	57
4.3.4. FACS-Sortierparameter von Zellen der Gruppe 3 (Spermatozyten I)	58
4.3.5. FACS-Sortierparameter von Zellen Gruppe 4 (Spermatozyten II)	59
4.3.6. FACS-Sortierparameter von Zellen der Gruppe 5 (Spermatiden)	60
4.4. FACS-Analyse und FACS-Sort der Knochenmarkzellen	61
4.5. Kontrolle der sortierten Zellen mittels RT-PCR	63
4.5.1. ABCG2-Expression in Hodenzellen und Knochenmark	64
4.5.2. c-Kit-Expression in Hodenzellen	65
4.5.3. CatSper1 Expression in Hodenzellen	65

---

4.5.4. CREM- $\tau$ -Expression in Hodenzellen	66
4.5.5. $\beta$ -actin-Expression in Hodenzellen	66
4.6. Sortierprotokoll und Hodenpopulationen	67
<b>5. Diskussion</b>	70
5.1. Zellpopulationen des Hodens	70
5.1.1. SP-Zellen/ Testikuläre Stammzellen	70
5.1.2. Spermatogonien A	71
5.1.3. Spermatogonien B	72
5.1.4. Spermatozyten I	73
5.1.5. Spermatozyten II	73
5.1.6. Spermatiden	73
5.2. Techniken	74
5.3. Kritische Betrachtung	77
5.4. Ausblick	78
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	82
<b>7. Anhang</b>	93
7.1. Tabellenverzeichnis	93
7.2. Abbildungsverzeichnis	94
7.3. Formelverzeichnis	95
7.4. Abkürzungsverzeichnis	96
<b>8. Publikation</b>	99
<b>9. Danksagung</b>	100

## 1. Zusammenfassung

### Isolation definierter Zellgruppen der Spermatogenese mithilfe von Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

**Autor: Thomas Jähn**

Die Spermatogenese beschreibt den Prozess der männlichen Keimzellreifung. Während der Spermatogenese differenzieren testikuläre Stammzellen über Spermatogonien A und B, Spermatozyten I und II Ordnung zu Spermatischen. Um die Eigenschaften, Funktionen und Veränderungen der unterschiedlichen Zellen der Spermatogenese detailliert untersuchen zu können, müssen sie aus einer gemischten Hodenzellsuspension heraus präzise und vorhersagbar isoliert werden. Ziel dieser Arbeit war es ein Sortierprotokoll mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) für testikuläre Zellpopulationen zu erstellen, durch das morphologisch intakte und vitale Zellen eindeutig separiert werden können.

In dieser Arbeit erfolgte initial die Erstellung einer Einzelzellsuspension des Hodens der C57 black/6 (C57BL/6) Maus. Die DNA der Hodenzellen wurde mit Hilfe des Vitalfarbstoffs Hoechst 33342 gefärbt und ihre Zelloberflächenantigene wurden mit den an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern anti-Thy-1, anti- $\alpha$ -6-integrin und anti-c-Kit markiert. Anschließend erfolgte die Sortierung der Hodenzellpopulationen anhand ihrer Hoechst 33342-Fluoreszenz, ihres DNA-Gehalts und ihrer Zelloberflächenantigenpräsentation mit der Methodik des FACS. Die mittels FACS sortierten Hodenzellpopulationen wurden zur Überprüfung der Sortierkriterien hinsichtlich Zell-spezifischer Genexpressionen mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht.

Zur Separation von testikulären Zellpopulationen wurde folgendes FACS-Protokoll erstellt: Testikuläre Stammzellen wurden anhand der Parameter niedrige blaue und rote Hoechst 33342-Fluoreszenz, DNA-Gehalt= "Side Population" (SP), Thy-1<sup>hi</sup>,  $\alpha$ -6-integrin<sup>+</sup> und c-Kit<sup>-</sup> sortiert, Spermatogonien A anhand der Kriterien mittlere blaue und rote Hoechst 33342-Fluoreszenz, DNA-Gehalt=2n,  $\alpha$ -6-integrin<sup>+</sup> und c-Kit<sup>hi</sup>, Spermatogonien B anhand intensiver blauer und mittlerer rote Hoechst 33342-Fluoreszenz, DNA-Gehalt=4n,  $\alpha$ -6-integrin<sup>+</sup> und c-Kit<sup>+</sup>, Spermatozyten I Ordnung anhand intensiver blauer

und roter Hoechst 33342-Fluoreszenz, DNA-Gehalt=4n,  $\alpha$ -6-integrin<sup>lo/-</sup> und c-Kit<sup>lo/-</sup>, Spermatozyten II Ordnung anhand mittlerer blauer und intensiver roter Hoechst 33342-Fluoreszenz, DNA-Gehalt=2n,  $\alpha$ -6-integrin<sup>-</sup> und c-Kit<sup>-</sup> und Spermatisden anhand der Parameter niedrige blaue und rote Hoechst 33342-Fluoreszenz, DNA-Gehalt=1n,  $\alpha$ -6-integrin<sup>-</sup> und c-Kit<sup>-</sup>. Zur Überprüfung der Sortierkriterien wurde mittels RT-PCR eine Genexpression von ABCG2 für die Gruppe der testikulären Stammzellen, von c-Kit für Spermatozyten A und B, von CREM- $\tau$  für Spermatozyten I und II und von Catsper1 für Spermatisden nachgewiesen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass testikuläre Stammzellen, Spermatozyten A und B, Spermatozyten I und II Ordnung, sowie Spermatisden mittels FACS-Analyse in sechs getrennte Populationen sortiert werden können. Aus den Ergebnisse resultiert ein Protokoll, das eine akkurate und prognostisch sichere Trennung der Hodenzellen von morphologisch intakten und vitalen Populationen nach DNA-Gehalt und Zelloberflächenantigenen mittels FACS ermöglicht.



## Summary

### Isolation of distinct spermatogonial cell populations using Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

**Author: Thomas Jähn**

Spermatogenesis defines the process of male germline maturation. During spermatogenesis testicular stem cells differentiate to spermatids after undergoing the cell stages of spermatogonia type A and B, primary and secondary spermatocytes. To investigate cell properties, functions and pathologies of each cell type, precise isolation of cells from a heterogeneous testicular cell suspension is a prerequisite. In this study we aimed to set up a sort protocol for Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) by which distinct testicular cell populations can be separated.

Initially, we generated a single cell suspension of the C57BL/6 mouse testis. The single cell suspension was stained with the vital dye Hoechst 33342. Additionally, we used cell surface markers anti-Thy-1, anti- $\alpha$ -6-integrin, and anti-c-Kit to mark cell surface proteins. After preparation of the single cell suspension, we sorted the testicular cells by FACS according to their Hoechst 33342-fluorescence patterns, DNA content, and cell surface proteins. Sort criteria were verified by investigation of cell type specific gene expression patterns using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

The following FACS-protocol for separation of testicular cell populations was set up: Testicular stem cells were isolated by using the sort criteria low blue and red Hoechst 33342-fluorescence, DNA content= Side Population (SP), antigenic phenotype Thy-1<sup>hi</sup>,  $\alpha$ -6-integrin<sup>+</sup>, and c-Kit<sup>-</sup>, spermatogonia type A by the criteria medium blue and red Hoechst 33342-fluorescence, DNA content=2n, antigenic phenotype  $\alpha$ -6-integrin<sup>+</sup>, and c-Kit<sup>hi</sup>, spermatogonia type B by the criteria intensive blue and medium red Hoechst 33342-fluorescence, DNA content=4n, antigenic phenotype  $\alpha$ -6-integrin<sup>+</sup>, and c-Kit<sup>+</sup>, primary spermatocytes by the criteria intensive blue and red Hoechst 33342-fluorescence, DNA content=4n, antigenic phenotype  $\alpha$ -6-integrin<sup>lo/-</sup>, and c-Kit<sup>lo/-</sup>, secondary spermatocytes by the criteria medium blue and intensive red Hoechst 33342-fluorescence, DNA content=2n, antigenic phenotype  $\alpha$ -6-integrin<sup>-</sup>, and c-Kit<sup>-</sup>, and spermatids were separated using the criteria low blue and red Hoechst 33342-

fluorescence, DNA content=1n, antigenic phenotype  $\alpha$ -6-integrin<sup>-</sup>, and c-Kit<sup>-</sup>. RT-PCR revealed gene expression of ABCG2 in the group of testicular stem cells, expression of c-Kit for spermatogonia type A and B, expression of CREM- $\tau$  for primary and secondary spermatocytes, and expression of Catsper1 for spermatids.

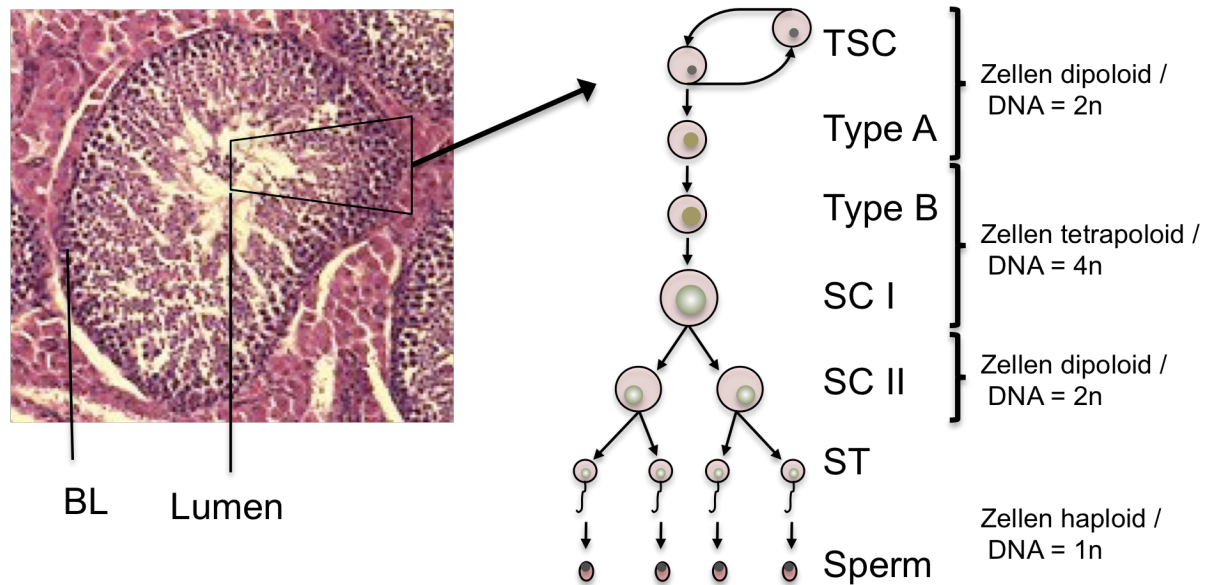
In this study we set up a sort protocol for FACS analysis by which testicular stem cells, spermatogonia type A and B, primary and secondary spermatocytes, and spermatids can be isolated from a single cell suspension and separated into 6 distinct cell populations according to their Hoechst 3342-fluorescence pattern, DNA content, and antigenic phenotype. This sort protocol allows for a distinct and prognostically safe separation of testicular cells revealing morphologically intact and vital cells for further investigation.

## 2. Einleitung

### 2.1. Hoden und Spermatogenese

Der paarig angelegte Hoden (Testes) ist Teil der männlichen Reproduktionsorgane, in welchen die Keimzellen (Gameten) gebildet werden. Der Entstehungsprozess der Gameten wird als Spermatogenese bezeichnet und lässt sich bei Säugern in zwei verschiedene Phasen unterteilen: die Spermatozytogenese (Mitose) und die Spermiogenese (Meiose). Beide Phasen der Zellreifung sind in den Hodenkanälchen (Tubuli seminiferi) lokalisiert (Oakberg 1957).

Während der Spermatozytogenese kommt es initial an der Basallamina (BL) der Tubuli seminiferi zu einer klonalen Vermehrung der testikulären Stammzellen (TSC). Die Klone differenzieren zu Spermato gonien Typ A. Der folgende Abschnitt der Spermatozytogenese ist gekennzeichnet von einer mitotischen Teilung der Spermato gonien A und umfasst die Bildung von Tochterzellen. Hierbei wird schließlich eine Tochterzelle, die jetzt als Spermato gonie Typ B bezeichnet wird, in die Spermiogenese eingeschleust. Alle drei Zellen, TSC, Spermato gonien A und Spermato gonien B haben einen diploiden Chromosomensatz (Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Gehalt= $2n$ ). Nach einer weiteren mitotischen Teilung entstehen aus den Spermato gonien B die Spermatozyten erster Ordnung (Spermatozyten I). Die Spermatozyten I verdoppeln ihren DNA-Gehalt, besitzen nun einen tetraploiden Chromosomensatz (DNA-Gehalt= $4n$ ) und treten in die erste Reifeteilung (Reduktionsteilung) der Meiose ein. An deren Ende stehen die Spermatozyten zweiter Ordnung (Spermatozyten II) mit einem diploiden Chromosomensatz (DNA-Gehalt= $2n$ ). In der Prophase der Reduktionsteilung kommt es zur Rekombination des mütterlichen und väterlichen Erbmaterials. Die Prophase beträgt beim Menschen ca. 20 Tage. Auf die Prophase folgen schnell Meta-, Ana- und Telophase. Diese Phasen der zweiten Reduktionsteilung nehmen beim Menschen nur wenige Stunden in Anspruch. Nach der zweiten Reifeteilung entstehen die Spermatoziden, welche einen haploiden Chromosomensatz aufweisen (DNA-Gehalt= $1n$ ). Die Spermatoziden werden in das Lumen der Tubuli seminiferi entlassen (Heller 1963; Fawcett 1970; Dym 1973; Bennett 1977).



**Abbildung 1: Spermatogenese im Hoden.** Die Abbildung zeigt den Querschnitt durch einen Tubulus seminiferus. Im Bereich der Basallamina (BL) befindet sich das Reservoir der testikulären Stammzellen, die Ursprung der kontinuierlichen Keimzellproduktion sind. Spermatiden werden in das zentral liegende Lumen des Tubulus entlassen. In dem keilförmig markierten Bereich finden sich alle Zellstadien der Spermatogenese. Rechts im Bild sind diese schematisch dargestellt. Beginnend bei testikuläre Stammzellen (TSC) über Spermatogonien A (Type A), Spermatogonien B (Type B), Spermatozyten I (SC I), Spermatozyten II (SC II), Spermatiden (ST) bis hin zu Spermien (Sperm).  
(Bildquelle: ACADEMIC [www.de.academic.ru](http://www.de.academic.ru))

Die Spermatiden unterlaufen während der Reifung zum Spermium noch einige zytologische Differenzierung. Hierzu gehören Kernkondensation, Zellplasmaverlust, die Ausbildung einer Kinozilie und Entstehung des Akrosoms, damit das Spermium in der Lage ist, die weibliche Oozyte zu befruchten (Austin 1952; Lalli 1981)

Die Spermatogenese ist ein komplexer und schrittweise ablaufender Reifungsprozess, der mit der Differenzierung von Stammzellen beginnt und differenzierte Spermatozoen hervorbringt (Chiarini-Garcia 2001). Die Keimzellproduktion in erwachsenen Säugern verläuft kontinuierlich und jeder Entwicklungsschritt geschieht parallel im Inneren der Tubuli seminiferi des Hodens (Russell 1990). Eine Einzelzellsuspension des Hodens ist daher heterogen, da sie mitotische und meiotische Zellen, sowie haploide, diploide und tetraploide Zellen enthält (Bastos 2005).

## 2.2. ABC-Transporter

Der energieabhängige Transport membrandurchspannender Proteine befähigt Zellen, die diese Membrantransporter besitzen zu besonderen Stoffwechsellleistungen. Im Folgenden werden die strukturellen Eigenschaften und Fähigkeiten der Adenosin-Triphosphat-Binding-Cassett (ABC)-Transporter erläutert. Des Weiteren wird ein

Mitglied dieser Transporterfamilie detailliert vorgestellt, dessen Lokalisation im Hoden und auf testikulären Stammzellen nachgewiesen wurde.

### 2.2.1. ABC-Transporter

Die größte Gruppe der Transmembrantransporter ist die ABC-Transportergruppe. Lokalisiert sind die ABC-Transporter in der Plasmamembran eukaryotischer und prokaryotischer Zellen sowie in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums, der Peroxisomen und der Mitochondrien. Die ABC-Transporter können diverse Substanzen wie Kohlenhydrate, Proteine, Lipide und weitere hydrophobe Verbindungen über die Zellmembran transportieren (Dean 2001). Strukturell bestehen die ABC-Transporter aus zwei Nukleotidbindungsstellen (NBS) und zwei Transmembrandomänen (TMD) (Sarastre 1982; Higgins 1986).

An der NBS der TMD findet die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) und organischem Phosphat statt. Die bei dieser Hydrolyse freiwerdende Energie wird für den Transport von Substraten über die Membran genutzt (Dean & Allikmets 1995). Die TMD besteht aus 6-12 Membran-durchspannenden  $\alpha$ -Helices und gewährleistet eine substratspezifische Bindung. In Eukaryoten sind die meisten ABC-Transporter für den Export von zumeist hydrophoben Substanzen aus dem Zytoplasma in den Extrazellularraum zuständig (Dean 2001). Die eukaryotischen ABC-Gene kodieren entweder für sogenannte Volltransporter oder Halbtransporter (Hyde 1990). Volltransporter enthalten zwei NBS und zwei TMD, während Halbtransporter zum Erlangen der Funktionalität homo- beziehungsweise heterodimerisieren müssen (Hyde 1990; Dean 2001).

Die ABC-Transporter können bei Säugern in Unterfamilien aufgeteilt werden. Im humanen Genom bestehen die ABC-Transporter aus 48 Genen und können in sieben Unterfamilien (ABCA-ABCG) aufgeteilt werden. Die Unterscheidungsmerkmale sind Organisation der Proteinbindungsstellen und Sequenzhomologien ihrer NBS und TMD (Dean 2001).

Der Transmembrantransporter ABCB1 transportiert unidirektional diverse Wirkstoffe, wie zum Beispiel Vincaalkaloide, Anthrazykline, Aktinomycin-D und Paclitaxal (Ambudkar 1999, Gottesman 2002). Daher erhielt der ABCB1-Transporter auch den Namen Multi-Drug-Resistance-Protein (MDR). Ein weiterer für den ABCB1-Transporter synonym verwandter Name ist P-Glykoprotein. Dieses Protein wurde als erster ABC-Transporter im humanen Organismus charakterisiert. Das Protein exportiert zytotoxische Substanzen aus Zellen und übernimmt so eine Schutzfunktion für hämatopoetische Stammzellen (HSC) (Chaudhary 1991; Sarkadi 2006). Weiterhin ist P-Glykoprotein im Bereich der Blut-Hirn-Schranke lokalisiert (Juliano 1976; Gottesman

2002). Durch die Expression von ABC-Transportern in maligne entarteten Geweben erreichen Tumorzellen eine Resistenz gegenüber vielen chemotherapeutischen Substanzen (Ambudkar 1999). Das MDR konnte ebenfalls in testikulären Zellen und Zellen der Spermatogenese nachgewiesen werden, wo es einen Beitrag zur Reduktion von zytotoxischen Substanzen übernimmt (Meliane 2002).

Untersuchungen hinsichtlich der Multidrug-Resistenz zeigen, dass nicht MDR alleine für den Export von hydrophoben Substanzen und Chemotherapeutika aus der Zelle verantwortlich ist. Ein weiterer ABC-Transporter wurde identifiziert, der ähnliche Eigenschaften wie MDR aufweist und daher als Multi-Drug-Resistance-associated-Protein (MRP) bezeichnet wurde (Cole 1993). Zellen die das Gen ABCC1 exprimieren, was für MRP codiert, sind befähigt natürliche und hydrophobe Substanzen wie Glutathion und Glutathionkonjugate oder Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Doxorubicin und Methotrexat in einem energieabhängigen Transport aus der Zelle zu transportieren (Müller 1994; Loe 1998; Gottesman 2002).

Die Ergebnisse von Cole et al. initiierten eine Suche nach weiteren Mitgliedern der ABC-Transporterfamilie.

### **2.2.2. ABCG2 (BCRP, ABCP, MXR)**

Der humane ABCG2-Transporter wurde von drei verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig identifiziert. Doyle et al. gelang die Identifikation eines Transporters aus einer mit Verapamil inkubierten Brustkrebs-Zelllinie, die Eigenschaften der Multidrug-Resistenz aufwies, aber weder das Gen für ABCB1 (MDR) noch für ABCC1 (MRP) exprimierte. Deshalb wurde der Transporter zunächst Breast-Cancer-Resistance-Protein (BCRP) genannt (Doyle 1998). Allikmets et al. konnten mittels genetischer Analyse aus humaner Plazenta-DNA die komplementäre DNA (cDNA) von ABCG2 isolieren. Dieser Transporter wurde wegen seiner Lokalisation ABCP-Transporter genannt (Allikmets 1998). Miyake et al. gelang etwas später ebenfalls die Isolation der cDNA von ABCG2 aus Kolon-Karzinom-Zelllinien, die resistent gegen Anthrachinon und Mitoxantron waren, und bezeichnete den Transporter als Mitoxantron-Resistance-Transporter (MXR) (Miyake 1999). Die Ergebnisse dieser drei Arbeiten zeigen unabhängig voneinander, dass für die Medikamenten-Resistenz nicht ausschließlich die Transporter ABCB1 und ABCC1 verantwortlich sind, sondern auch ABCG2. Der ABCG2-Transporter exportiert wie die anderen ABC-Transporter ebenfalls Chemotherapeutika und hydrophobe Substanzen aus der Zelle (Sarkadi 2004).

Die Medikamenten-Resistenz des ABCG2-Transporters und sein breites Substratspektrum, das sowohl positiv wie auch negativ geladene Substanzen wie z. B. (zum Beispiel) Mitoxantron, Doxorubicin, Daunorubicin und Topotecan beinhaltet, ist

von größter klinischer Relevanz, weil ABCG2 in der Lage ist, Chemotherapeutika aus der Zelle zu eliminieren und ihre therapeutische Wirkung zu limitieren (Nakagawa 2002; Sarkadi 2004; Robey 2007). Auch in maligne entarteten Geweben findet der Auswärtstransport zytotoxischer Substanzen statt, die in der onkologischen Therapie von Bedeutung sind (Krishnamurthy 2006). Darüber hinaus spielen die Transporter noch eine Rolle bei auswärts gerichteten Transport von Antibiotika, wie Makroliden, Fluorchinolonen und Tetrazyklinen, aus Zellen (Suzuki 2003; Janvilisri 2005; Ando 2007).

Der ABCG2-Transporter wird in vielen Zellen exprimiert. Er findet sich in exkretorisch tätigen Geweben, in Geweben, die an Resorptionsvorgängen beteiligt sind, und in solchen, die natürliche Schranken des Körpers bilden, wie zum Beispiel den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke. Cisternino zeigte, dass ABCG2 im Gehirn von ABCB1 defizitären Mäusen dreimal höher exprimiert ist als in Wildtyp-Mäusen (Cisternino 2004). Weitere Lokalisationen von ABCG2 sind die Blut-Hoden-Schranke und der Nebenhoden (Bart 2004; Fetsch 2006; Enokizono 2007; Enokizono 2008). Außerdem konnten Lassalle et al. die Expression von ABCG2 in Stammzellen des Hodens nachweisen (Lassalle 2004).

### **2.3. Hoechst 33342 und das SP-Phänomen**

Einleitend wurde beschrieben, dass während der Spermatogenese Hodenzellen mit gleichem und unterschiedlichem Ploidiegrad auftreten, deren Untersuchung und Charakterisierung mittels Hoechst 33342 durchgeführt wurde.

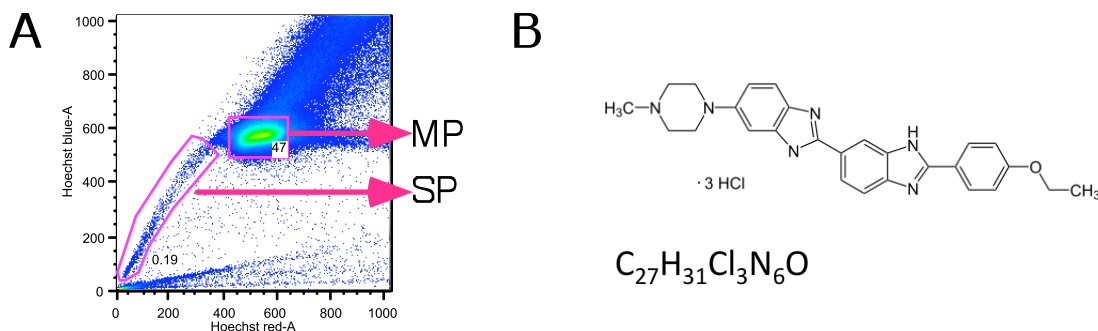
#### **2.3.1. Vitalfarbstoff Hoechst 33342**

Der zur Klasse der bis-benzimidazole gehörende Farbstoff Hoechst 33342 vereinigt auf sich wichtige Fähigkeiten, die eine Untersuchung von Zellen hinsichtlich ihres Ploidiegrades (Mullaney 1974), ihres Zellzyklusstatus (Dean 1974; Gray 1974; Leemhuis 1996) und des DNA-Gehalts (Kraemer 1972) ermöglichen. Die Analyse dieser DNA-bezogenen Merkmale ist möglich, weil Hoechst 33342 durch die Plasmamembran diffundiert und gezielt an Adenosin- und Thymin-reiche Regionen der DNA bindet (Latt 1975; Lalande 1979).

Anders als bei Untersuchungen an fixierten Zellen bietet der Vitalfarbstoff Hoechst 33342 die Möglichkeit lebende Zellen anhand von DNA-Qualität und DNA-Quantität mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) zu untersuchen (Arndt-Jovin 1977).

### 2.3.2. SP-Phänomen

Die Inkubation hämatopoetischer Zellen mit dem oben beschriebenen Vitalfarbstoff Hoechst 33342 ermöglicht, die Aufteilung der Knochenmarkzellen in verschiedene Subpopulationen. Eine dieser Subpopulationen wird, dadurch dass sie Hoechst 33342 aktiv aus dem Zelllumen heraus transportiert, nur niedrig gefärbt. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung im roten und blauen Wellenlängenbereich erscheinen die Zellen dieser Subpopulation durch niedrige rote und blaue Fluoreszenz getrennt von der Hauptzellpopulation oder Main Population (MP) und werden daher als Side Population (SP) bezeichnet (Goodell 1996). Dieses Erscheinungsbild in der Hoechst-Darstellung wird als SP-Phänomen bezeichnet.



**Abbildung 2: Hoechst 33342.** **A:** Die Abbildung zeigt Knochenmarkzellen nach Inkubation mit Hoechst 33342 im Hoechstprofil in der Betrachtung blauer und roter Wellenlänge. Zellen der Side Population (SP) können Hoechst 33342 aus der Zelle transportieren und stellen sich mit niedriger blauer und roter Fluoreszenz dar. Zellen der Hauptpopulation (MP) besitzen diese Fähigkeit nicht und stellen sich zentral im Hoechstprofil dar. **B:** Darstellung der Struktur und Summenformel von Hoechst 33342 (Invitrogen (Molecular Probes)).

Untersuchungen zeigten, dass speziell ein Mitglied der ABC-Transporterfamilie für das Zustandekommen dieses SP-Phänomens verantwortlich ist. Das ABCG2 Protein gewährleistet den speziellen Efflux von Hoechst 33342 (Goodell 1996; Zhou 2001; Scharenberg 2002, Kim 2002). Goodell et al. zeigte, dass der ABCG2 Transporter maßgeblich für das SP-Phänomen verantwortlich ist. Denn durch gezielte Blockade des Transporterproteins durch Verapamil kommt es zum vollständigen Verlust der SP in der Analyse mittels Durchflusszytometrie (Goodell 1997; Bunting 2000). ABCG2 wird in Zellen des murinen und humanen Knochenmarks der Side Population sowie in mutmaßlichen hämatopoetischen Stammzellen, welche SP-positiv (SP+) und Cluster of Differentiation 34 positiv (CD34+) sind, stark exprimiert. Die Tatsache, dass SP-Zellen diese Stammzellmerkmale aufweisen, lässt die Vermutung zu, dass hämatopoetische Stammzellen anhand der Darstellung von Hoechst blue gegen Hoechst red suffizient isoliert werden können (Kim 2002). Ein weiteres Indiz für die Richtigkeit dieser Annahme ist, dass die Expression des ABCG2 Transporters mit Reifung der



Vorläuferzellen reduziert wird und komplett ausgereifte Zellen negativ für ABCG2 sind (Goodell 1997; Zhou 2001; Scharenberg 2002). Das SP-Phänomen ist nicht nur auf hämatopoetische Stammzellen beschränkt, sondern ist auch charakteristisch für Stammzellen aus anderen Geweben (Zhou 2002).

### **2.3.3. Hodenzellen im Hoechst-Profil**

Die Betrachtung der Hodenzellen im Hoechst-Profil hinsichtlich des Emissionsspektrums im roten und blauen Wellenlängenbereich lässt die Einteilung der Zellpopulationen hinsichtlich des DNA-Gehalts der Zellen zu (Lassalle 2004; Bastos 2005). Zur Begriffsklärung und besserem Verständnis werden folgend die Hodenzellpopulationen im Hoechstprofil beschrieben.

Wie im Knochenmark findet sich, nach der Inkubation von Hodenzellen mit Hoechst 33342, auch eine Zellpopulation, die sich durch niedrige blaue und rote Fluoreszenz kennzeichnet und der SP entspricht (Zhou 2001; Lassalle 2004). Im Hoechstprofil liegt zentral eine Population mit diploiden Zellen, die wegen des zweifachen DNA-Gehalts für die weitere Beschreibung als 2n-Population bezeichnet wird. Oberhalb der 2n-Population liegt im Hoechst-Profil eine Gruppe tetraploider Zellen, die wegen ihres vierfachen DNA-Gehalts durch eine besonders hohe rote und blaue Fluoreszenz gekennzeichnet ist und in der weiteren Beschreibung als 4n-Population benannt ist. Unterhalb der 2n-Population neben der SP liegt im Hoechst-Profil eine Gruppe haploider Zellen, die einen einfachen DNA-Gehalt hat und weiterführend als 1n-Population beschrieben wird (Lassalle 2004; Bastos 2005).

### **2.4. Zellstadien-abhängige Proteinexpression während der Spermatogenese**

Wie oben beschrieben durchlaufen Hodenzellen von der Stammzelle bis zum Spermatozoon verschiedene Mitose- und Meioseabschnitte. Während dieser Phasen synthetisiert die Hodenzelle Proteine, die zu Beginn der Entwicklung für den Erhalt und die Kommunikation der Zellen untereinander wichtig sind und gegen Ende für die Funktion des Spermiums Bedeutung haben. Folgend werden die Proteine vorgestellt, die in dieser Arbeit genutzt wurden, um die unterschiedlichen Entwicklungsphasen der Hodenzellen zu definieren.

### 2.4.1. ABCG2-Expression

Der bereits oben beschriebene energieabhängige Transporter ABCG2 befähigt Zellen, in denen er exprimiert wird, hydrophobe Substanzen aus dem Zytoplasma in den Extrazellularraum zu befördern. Nach einer Inkubation der Zellen mit dem Farbstoff Hoechst 33342 und einer anschließenden wellenlängenabhängigen Fluoreszenzanalyse mittels FACS lassen sich Zellen identifizieren, die ABCG2 exprimieren. Sie stellen sich als Zellen in einer Subpopulation niedriger roter und blauer Fluoreszenzen dar und werden daher SP-Zellen genannt (Goodell 1996). Im Knochenmark ist das Zustandekommen des SP-Phänomens ABCG2-Transporter-abhängig (Zhou 2001; Scharenberg 2002). Weitere Untersuchungen zeigen, dass Knochenmarkzellen, die in der SP-Population erscheinen, eine hohe Stammzellaktivität aufweisen (Goodell 2007). Einen klaren Zusammenhang zwischen ABCG2-abhängigen SP-Phänomenen und Stammzellaktivität zeigte Goodell et al. mit einem Transplantationsversuch bei Mäusen. Diese Tiere wurden einer Strahlendosis ausgesetzt, welche die Hämatopoese des Knochenmarks vollständig einstellt, was nachführend zum Tod der Tiere führt. Im Transplantationsversuch werden Knochenmarkzellen, die mittels Hoechst 33342 in der SP angereichert werden einer Gruppe der bestrahlten Mäuse implantiert. Mäuse die Zellen aus der SP-Region erhalten, zeigen eine bedeutend höhere Rate von rekonstituierter Hämatopoese als Mäuse, denen unselektierte Knochenmarkzellen implantiert werden (Goodell 1996).

Auch für Hodenzellen ist beschrieben, dass sich eine SP nach Hoechst 33342-Inkubation mit anschließender FACS darstellen lässt (Zhou 2002). Wie im Knochenmark basiert die Anreicherung in der SP auf dem aktiven Transport von Hoechst 33342 durch den Transmembrantransporter ABCG2 aus der Hodenzelle hinaus (Bunting 2000; Lassalle 2004). Es erfolgten Transplantationsversuche von SP-angereicherten Hodenzellen an Busulfan-behandelten Mäusen. Die Busulfan-Behandlung führt bei Mäusen zum Absterben aller Hodenzellen und nachfolgend zum Ausbleiben der Spermatogenese. Die Implantation von Hodenzellen aus der SP-Region führt bei Busulfan-behandelten Mäusen zum Wiedereinsetzen der Spermatogenese in den Tubuli seminiferi. Im Transplantationsversuch mit Hodenzellen zeigt sich ein 13-fach (Falciatori 2004) beziehungsweise 15-fach (Lassalle 2004) höheres Wiedereinsetzen der Spermatogenese bei Hodenzellen aus der SP-Region, als bei transplantierten Hodenzellen, die nicht fraktioniert werden.

Die hohe Koinzidenz von ABCG2-Expression und Stammzellfunktion erklärt, warum der Nachweis von ABCG2 als Stammzellmarker sinnvoll ist.

### 2.4.2. c-Kit Expression

Die Tyrosinkinase KIT (Synonym: c-Kit oder CD 117) gehört zu der Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. c-Kit spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen. Manova et al. konnte 1990 erstmals nachweisen, dass c-Kit während der Spermatogenese von den Spermatogonien A und B, sowie von den frühen Spermatozyten I gebildet wird (Manova 1990). Durch einen spezifischen monoklonalen anti-c-Kit-Antikörper (ACK2) kann selektiv die Funktion von c-Kit gehemmt werden. Bei der histologischen Untersuchung der Tubuli seminiferi von Mäusen denen 36 Stunden zuvor ACK2 gespritzt wurde, beobachtete Yoshinaga et al. das vollständige Verschwinden der Spermatogonien. Die noch undifferenzierten Spermatogonien A sowie die bereits entwickelten Spermatozyten I und II wurden durch ACK2 nicht gehemmt und waren weiterhin nachweisbar (Yoshinaga 1991). Untersuchungen von Packer et al. zeigen, dass die Funktion von c-Kit für das Verhindern der Apoptose und die kontinuierliche Zellentwicklung bis hin zu dem späten meiotischen Stadium der Spermatozyten verantwortlich ist (Packer 1995).

Übereinstimmend mit den vorangegangenen Untersuchungen zeigte Vincent, dass c-Kit in den Spermatogonien A und B exprimiert wird (Manova 1990; Yoshinaga 1991; Vincent 1998). Darüber hinaus konnte er mittels transgener LacZ Mäusen in der FACS-Analyse eine Koexpression zwischen dem Entwicklungsstadium-spezifischen-Protein Sycp1, welches spezifisch pachytene Spermatozyten markiert, und c-Kit nachweisen. Außerdem wurde eine Expression von c-Kit in pachytenen Spermatozyten mittels reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) nachgewiesen (Vincent 1998). Dieses Ergebnis belegt die Beobachtung, dass c-Kit im frühen Spermatozytenstadium für das weitere Heranreifen von Spermatischen von Bedeutung ist (Packer 1995; Vincent 1998) und dass der Nachweis von c-Kit spezifisch für Spermatogonien A und B sowie für pachytene Spermatozyten ist.

### 2.4.3. CREM- $\tau$ Expression

Die Spermatogenese beinhaltet eine Serie von Reifungsschritten, die einer engen Kontrolle und Koordination der Hypophysen-Hypothalamus-Gonaden-Achse unterliegen (Santen 1987). Die biochemische Modulation erfolgt durch den Botenstoff zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP). Das Gen cAMP-responsive Element Modulator (CREM) kodiert altersabhängig für unterschiedliche CREM-Proteine (Foulkes 1992). Bei der Maus finden sich präpubertär, also noch vor Beginn der Meiose die cAMP-antagonistischen Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$ . Während der Pubertät der Maus mit dem Beginn der ersten Keimzellbildung, ungefähr 13 bis 14 Tage nach

Geburt, findet sich fortwährend nur noch die Isoform CREM- $\tau$  als Aktivator der cAMP abhängigen Signaltransduktion (Foulkes 1992).

Ursache für den Expressionswechsel der CREM-Isoformen und ein Zeichen für die enge Korrelation von Hypophyse und Keimzellreifung ist die Abhängigkeit vom Follikel stimulierenden Hormon (FSH). So kann durch direkte FSH-Injektion in den Hoden von präpubertären Mäusen und bei Mäusen, deren Hypophyse chirurgisch entfernt wurde, eine CREM- $\tau$  Expression induziert werden (Foulkes 1993). Der Schritt der CREM- $\tau$  Aktivierung ist entscheidend für die Keimzellreifung, da gezeigt werden konnte, dass Mäuse mit einem Gendefekt, der eine Bildung von CREM- $\tau$  verhindert (Maus  $-/-$ ), im Entwicklungsstadium der frühen Spermatogenese stehen bleiben (Sassone-Crosi 1998). Der zeitgenaue und FSH-abhängige Expressionswechsel zu CREM- $\tau$  mit der ersten Serie der Keimzellreifung sowie der Stillstand der Spermatogenese bei Mutationen von CREM- $\tau$  belegen, dass CREM- $\tau$  in Spermatozyten I und II, sowie in Spermatischen exprimiert wird (Foulkes 1992; Foulkes 1993, Sassone-Crosi 1998).

#### **2.4.4. CatSper Expression**

Das Cation Channel of Sperm-Gen (CatSper) kodiert für eine einzelne 6-Transmembrandomäne, welche strukturell der Transmembrandomäne von Kalium-Voltage-Dependent-Kanälen (KV-Kanälen) ähnelt. Die funktionellen Eigenschaften des CatSper haben am meisten Ähnlichkeiten mit Calcium-Voltage-Dependent-Kanälen (CaV-Kanälen). Die CaV-Kanäle bestehen aus vier 6-Transmembrandomänen (Ertel 2000; Ren 2001). CatSper messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) wurde nur in murinen und humanen Hodenzellen identifiziert (Ren 2001). CatSper ist besonders im Spermischwanz lokalisiert wo es für die Funktion des asymmetrischen Schwanzschlags der Spermienbewegung verantwortlich ist. Diese Hyperaktivität bei der Spermischwanzbewegung ist bei Mäusen, in denen das CatSper-Gen nicht exprimiert wird (CatSper  $-/-$ ) erheblich vermindert (Ren 2001; Wennemuth 2003). Ebenfalls von Bedeutung ist CatSper bei den Signalkaskaden während der frühen Kapazitation. Bei der Kapazitation kommt es zu einem schnellen Calcium  $Ca^{2+}$ -Einstrom (Carlson 2003). Dieser  $Ca^{2+}$ -Einstrom ist cAMP-induziert und ist nur bei Spermien nachweisbar, die das CatSper-Gen exprimieren (Ren 2001; Carlson 2003). Außerdem ist ein  $Ca^{2+}$ -Einstrom weder bei runden noch elongierten Spermatischen erkennbar, so dass der Nachweis ausschließlich in späteren Reifestadien der Spermatogenese gezeigt werden kann (Ren 2001).

### **2.4.5. Actb-Expression**

Stetig exprimierte Gene, wie  $\beta$ -actin (Actb) kodieren für Strukturproteine, welche unabhängig von Zelltyp, Zellstadium oder äußeren Einflüssen exprimiert werden und für den Grundstoffwechsel der Zelle wichtig sind. Aufgrund ihrer Eigenschaft werden diese Gene als Housekeeping Gene (HKG) bezeichnet.  $\beta$ -actin ist ein Strukturprotein das im Zytoskelett lokalisiert und für die Zellen hinsichtlich Zellbewegung, Zellintegrität und Zellstruktur von Bedeutung ist (Everaert 2011). Actb mit seinem Genprodukt ist eines der am häufigsten verwendeten HKG (Suzuki 2000; Pfaffl 2004; de Jonge 2007). Actb wurde als HKG bei semiquantitativen PCR-Analysen bereits von Zhou und Lassalle verwendet (Zhou 2001; Lassalle 2004).

## **2.5. Separationstechniken**

Die Fraktionierung von Zellen ist ein wichtiger Analyseschritt. Die oben beschriebene Spermatogenese ist ein Kontinuum von zellulären Reifungsprozessen, die bei der Stammzelle im Bereich der Basallamina beginnen und mit dem Entlassen der Spermatozyten in das Lumen der Tubuli seminiferi enden (Fawcett 1970; Dym 1973). Bei der Separation werden alle Zellen, die aus dem Gewebeverband herausgelöst sind und sich in einer heterogenen Einzelzellsuspension befinden in Hauptgruppen unterteilt. In den Hauptgruppen sind bei suffizienter Separationstechnik, Zellen gleicher Größe, Morphologie und Funktion enthalten. Die Zellen des Hodens sollten mit einer Separationstechnik in sechs Hauptgruppen zu unterteilen sein: die testikulären Stammzellen, Spermatozyten A und B, Spermatozyten I und II sowie den Spermatozyten. Auf diese Weise isolierte Hauptzellgruppen können auf bestimmte Eigenschaften, Funktionen und Veränderungen hin untersucht werden. Aufgrund einer einmaligen morphologischen und komplexen Struktur des Hodens sind die Ansprüche an eine Separationstechnik zur Aufteilung einer Einzelzellsuspension in bestimmte Zellgruppen sehr hoch. Qualitätsmerkmale einer Zellseparation sind maximale Zellausbeute, morphologisch intakte und vitale Zellen und Elimination zellulärer Trümmer (Bellvé 1977b).

### **2.5.1. Sedimentation**

Die erste Methode zur Dissoziation der Gewebestruktur und Fraktionierung der Hodenzellen beschrieb Romrell et al. (Romrell 1976). Dieser separierte die Hodenzellen mittels eines Bovinen-Serum-Albumin (BSA)-Konzentrationsgradienten. Bei dieser Methode wird die Sedimentationskammer vom Kammerboden mit Lösungen

unterschiedlicher Dichte beladen (Romrell 1976). Standardisiert wird die Sedimentationskammer bei 4° für 4 Stunden stehen gelassen, so dass sich die Zellen durch ein G (unit gravity) beschleunigt über den Gradienten bewegen können (Bellvé 1977a). Das Entladen der Kammer erfolgt vom Kammerboden aus. Hierbei werden Fraktionen von 5 ml oder 10 ml mit einer Flussgeschwindigkeit von 15 ml/min abgenommen und der Reihenfolge nach nummeriert. Ein Aliquot jeder Fraktion wird mikroskopisch untersucht und Proben mit identischen Zelltypen werden wieder zusammengefügt, um als neue Zellsuspension für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu stehen (Bellvé 1977a). Das Wissen, dass die Spermatogenese in einem bestimmten Alter der Entwicklung einsetzt und so die Hodenzellen zu einem bestimmten Zeitpunkt zum ersten Mal in differenziertere Zellstadien der Spermatogenese eintreten, ermöglicht eine Vorauswahl von Zellen durch die Verwendung von Versuchstiere bestimmten Alters (Bellvé 1977a). Diese Technik stellt die methodische Grundlage für die Selektion bestimmter Populationen dar. Brinster und Zimmermann führten ihre Stammzellversuche im Hoden auf der Basis der oben beschriebenen Sedimentationstechnik durch (Brinster & Zimmermann 1994). Zudem stellt die Methode ein unabdingbares Werkzeug longitudinaler Untersuchungen während der Reifungsprozesse der Spermatogenese dar, wie zum Beispiel der Untersuchung von Stadien-abhängiger Expression bestimmter Gene während der Spermatogenese (Vincent 1998). Als Nachteil dieser Methode beschreibt Bellvé et al. selbst eine abnehmende Homogenität und eine zunehmende Kontamination durch Sertolizellen der Zellproben zu späteren Entwicklungszeitpunkten der Spermatogenese (Bellvé 1977a).

### **2.5.2. Durchflusszytometrie**

Hoechst 33342 kann durch die Plasmamembran von Zellen diffundieren und gezielt an Adenosin- und Thymin-reiche Regionen der DNA binden (Latt 1975; Lalande 1979). Ein vielversprechender Ansatz zur Separation von Zellsuspensionen ist die Verwendung des DNA-Färbemusters durch Hoechst 33342. Mit ihm können die unterschiedlichen Zellen der Spermatogenese unterschieden werden, die sich in ihrem DNA-Gehalt unterscheiden. In Abhängigkeit der gebundenen Menge von Hoechst 33342 an der DNA entsteht ein komplexes Fluoreszenzprofil, in dem Zellgruppen anhand ihres Emissionsmusters detektiert werden können (Lassalle 2004, Bastos 2005). Durch ein bestimmtes Fluoreszenzmuster können die Zellgruppen hinsichtlich ihres DNA-Gehalts beurteilt werden (Mullaney 1974; Lassalle 2004). Der DNA-Gehalt einer Zelle lässt wiederum Rückschlüsse auf das Stadium in der Spermatogenese zu (Lassalle 2004, Bastos 2005).

Eine sichere Zuordnung von Emissionsmuster zu verschiedenen Zellen der Spermatogenese erfolgte bisher nicht. Auch die Unterscheidung zwischen Zellen gleichem Ploidiegrades mittels Durchflusszytometrie wurde bisher nicht untersucht.

## **2.6. Unterscheidung der Hodenzellen**

Hodenzellen lassen sich außer anhand ihres DNA-Gehalts, ihres Zellzyklusstatus auch anhand von charakteristischen Oberflächenantigenen unterscheiden. Das Expressionsmuster bestimmter Oberflächenantigene ist verantwortlich für die Differenzierung im Laufe der Spermatogenese und ermöglicht eine Unterscheidung zwischen den einzelnen Hodenzellpopulationen.

## **2.7. Testikuläre Stammzelle und SP-Region**

Die Charakterisierung und Identifikation der testikulären Stammzellen mittels Durchflusszytometrie wurde bereits vielfach beschrieben und durch funktionelle Untersuchungen bestätigt (Shinohara 2000a, 2000b; Kubota 2003; Lassalle 2004; Falciatori 2004). Im Folgenden werden die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungen unter Berücksichtigung ihrer Relevanz für die hier vorliegende Arbeit vorgestellt:

Die funktionelle Evaluation der als Stammzellen postulierten Populationen erfolgte immer nach dem Transplantations-Protokoll von Brinster und Zimmermann. Dabei wurde Mäusen Busulfan injiziert, was zur Zerstörung testikulärer Stammzellen führt (Jackson 1966; Bucci 1987). Der nachgewiesene Wiederbeginn der Spermatogenese nach Injektion potentieller Stammzellen in den Hoden solcher Mäuse beweist die Stammzellaktivität einer Zelle (Brinster und Zimmermann 1994). Eine Stammzellaktivitätssteigerung bezieht sich als Referenz immer auf die Stammzellaktivität, die nach Transplantation von einer unfraktionierten Hodenzellsuspension gemessen wird.

Für Zellen des Knochenmarks sowie andere Gewebe ist nachgewiesen, dass die Ausbildung der SP-Population ein eindeutiges Stammzellmerkmal ist (Goodell 1996; Gussoni 1999; Zhou 2001; Scharenberg 2002). Bei der Darstellung von Hodenzellen im Hoechst-Profil erscheint eine Zellgruppe mit charakteristischer niedriger blauer und roter Fluoreszenz, die definitionsgemäß SP-Population genannt wird (Falciatori 2004; Lassalle 2004; Bastos 2005; Challen 2006). Wie oben beschrieben konnte für diese Zellen die Wiederaufnahme der Spermatogenese nachgewiesen werden (Falciatori 2004).

Kubota et al. untersuchte die Oberflächenantigene der Hodenzellen zur Identifikation von testikulären Stammzellen. Er nutzte das Thymocyte differentiation antigen 1 (Thy-1), von dem bekannt ist, dass es von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird (Ling 1997, Randall 1998, Anderson 1999). Die stark Thy-1 positive Zellfraktion wurde in den Hoden von Busulfan-behandelten Mäusen transplantiert. Im Vergleich zu der unfraktionierten Hodenzellsuspension wurde bei Thy-1+ Hodenzellen eine 25fach höhere Stammzellaktivität gemessen (Kubota 2003).

Bei der Suche nach weiteren Merkmalen, die testikuläre Stammzellen charakterisieren, erfolgte die Untersuchung verschiedener Oberflächenantigene und zellmorphologischer Merkmale: Die Zellmorphologie wird bei der Durchflusszytometrie mittels Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) untersucht. Der FSC gibt Aufschluss über die Größe der Zelle, der SSC über die Granularität der Zelle. Die Zellmorphologie der hämatopoetischen Stammzellen entspricht einem niedrigen SSC und einem hohen FSC. Das Vorhandensein einer stammzelltypischen Zellmorphologie und dem Oberflächenantigen  $\alpha$ -6-integrin nutzte Shinohara zur Stammzellenanreicherung (Shinohara 2000b).  $\alpha$ -6-integrin wurde in vorangegangenen Untersuchungen als möglicher Stammzellmarker definiert (Shinohara 1999). Die Transplantation von Zellen mit niedrigem SSC und gleichzeitiger Expression des Oberflächenantigens  $\alpha$ -6-integrin in Busulfan-behandelte Mäuse zeigte eine im Vergleich zur unfraktionierten Hodenzellsuspension 23fach höhere Stammzellaktivität (Shinohara 2000b).

Neben den oben beschriebenen Antigenen wurde bei der Selektion von testikulären Stammzellen auch das Antigen c-Kit untersucht, weil es im Knochenmark hämatopoetische Stammzellen markiert. Im Gegensatz zum Knochenmark exprimieren die Hodenzellen mit der größten Stammzellaktivität kein c-Kit (Shinohara 2000b; Kubota 2003; Falciatori 2004).

### **2.7.1. Spermatogonien A im Hoechst-Profil**

Zur Darstellung der Spermatogonie A im Hoechstprofil liegen unterschiedliche Daten vor. Lassalle et al. konnte in der Hauptpopulation als diploide Zellen ausschließlich Sertoli- und Leydig-Zellen nachweisen. Die Spermatogonien A wurden in der SP-Population nachgewiesen (Lassalle 2004). Bastos et al. vermutete Spermatogonien im Hoechstprofil in einer Population mit variierendem DNA-Gehalt von  $2n$  bis  $4n$  zwischen der Hauptpopulation und der  $4n$ -Region (Bastos 2005). Falciatori et al. wies eine Zellgruppe außerhalb der SP-Region nach, welche bei der durchflusszytometrischen Untersuchung stark positiv auf den Antikörper gegen c-Kit reagierte (Falciatori 2004). Wie oben beschrieben kann c-Kit während der Spermatogenese in Spermatogonien nachgewiesen werden (Yoshinaga 1991; Sorrentino 1991; Vincent 1998; Schrans-



Stassen 1999), sodass Falciatori schlussfolgerte, dass die Zellen dieser Gruppe Spermatogonien sind.

### **2.7.2. Spermatogonien B und Spermatozyten I und II im Hoechst-Profil**

Spermatogonien B und Spermatozyten I treten im Hoechstprofil als 4n Population in Erscheinung (Lassalle 2004, Bastos 2005). Für die 4n-Population dient c-Kit als Nachweis für Spermatogonien B (Vincent 1998) und CREM- $\tau$  als Nachweis für Spermatozyten I (Foulkes 1993; Lassalle 2004). Spermatozyten I werden zudem mittels direktem fluoreszenzmikroskopischem Nachweis morphologischer leptotener, zygotener und pachytener Merkmale in der 4n-Population lokalisiert (Bastos 2005).

Die Spermatozyten II werden im Hoechstprofil der 2n-Population zugeordnet (Lassalle 2004, Bastos 2005), da semiquantitative Analysen der Population eine Expression von CREM- $\tau$  zeigen (Foulkes 1993; Lassalle 2004) und die Zellen anhand morphologischer Merkmale fluoreszenzmikroskopisch in der 2n-Population nachgewiesen werden (Bastos 2005).

Weitere Untersuchungen, die eine klare Unterteilung der tetraploiden Zellen in Spermatogonien B und Spermatozyten I ermöglichen oder eine strikte Trennung der beiden diploiden Zellpopulationen in Spermatogonien A und Spermatozyten II wurden bisher nicht durchgeführt.

### **2.7.3. Spermatischen im Hoechst-Profil**

Die semiquantitative Analyse der 1n-Population zeigt eine klare Expression von CREM- $\tau$ , das von Spermatischen exprimiert wird (Foulkes 1993; Lassalle 2004). Durch den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von runden und elongierten Spermatischen konnte bewiesen werden, dass in der 1n-Population Spermatischen lokalisiert sind (Bastos 2005). Weitere Untersuchungen hinsichtlich bestimmter Oberflächenantigene mittels FACS-Analyse liegen für diese Zellpopulation bisher nicht vor.

**Tabelle 1: Zusammenfassung bis jetzt bekannter Eigenschaften bei der FACS-Untersuchung.** TSC= testikuläre Stammzelle; **Type A**= Spermatogonie Type A; **Type B**= Spermatogonie Type B; **SC I**= Spermatozyte I Ordnung; **SC II**= Spermatozyte II Ordnung; **ST**= Spermatide; **BM-SP**= Knochenmarkzellen aus der SP-Region; **BM-nSP**= Knochenmarkzellen nicht aus der SP-Region; **SSC**= Side Scatter; **FSC**=Forward Scatter; **DNA**= DNA-Gehalt (Ploidiegrad). Nicht bekannte Eigenschaften der Hodenzellen in der FACS-Untersuchung sind in der Tabelle mit “/“ markiert.

	SSC	FSC	Thy-1	$\alpha$ -6-int	c-Kit	DNA	Hoechst 33342- Fluoreszenz / Hoechstprofil
<b>TSC</b>	lo	hi	hi	pos	neg	2n	niedrige blaue und rote / SP pos
<b>Type A</b>	/	/	/	/	hi	2n	/
<b>Type B</b>	/	/	/	/	/	4n	/
<b>SC I</b>	/	/	/	/	/	4n	/
<b>SC II</b>	/	/	/	/	/	2n	/
<b>ST</b>	/	/	/	/	/	1n	/
<b>BM-SP</b>	/	/	/	/	/	/	niedrige blaue und rote / SP pos
<b>BM-nSP</b>	/	/	/	/	/	/	SP neg

## 2.8. Fragestellung

Eine wichtige Voraussetzung, um homogene Zellpopulationen untersuchen zu können, ist die Fähigkeit, Zellen distinkt aus einer gemischten Zellsuspension heraus präzise und vorhersagbar zu selektieren. Die bisher genutzte Technik, Trennung durch Sedimentation, erfüllt nicht die oben genannten Anforderungen, da eine rein subjektive visuelle Zellaufteilung unter dem Lichtmikroskop erfolgt, welche insbesondere mit zunehmenden Reifestadien zu einer Inhomogenität der Zellpopulation und Verunreinigung derselben mit Sertolizellen führt (Bellvé 1977). Einen alternativen Ansatz zur Separation der Hodenzellen anhand ihres DNA-Gehalts bietet das FACS. Eine strikte Trennung von im Hoechstprofil morphologisch ähnlich erscheinenden Zellen, erfolgte bisher nicht (Lassalle 2004; Bastos 2005). Die detaillierte Charakterisierung der Zellen der Spermatogenese mittels vorgeschriebener Zellstadien-spezifischer Oberflächenantigenmuster (Shinohara 2000b, Kubota 2003; Falciatori 2004) zur sicheren Differenzierung der Zellen im Hoechst-Profil erfolgte bisher ebenfalls nicht.

Ziel dieser Arbeit war es, aus einer Hodenzellsuspension definierte Zellfraktionen zu gewinnen, die den sechs Stadien der Keimzellreifung von testikulärer Stammzelle über Spermatogonie A und B sowie Spermatozyte I und II bis zur Spermatide entsprechen.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Kann die Einteilung der Hodenzellen im Hoechstprofil als Grundlage für die Einteilung der Hodenzellpopulationen genutzt werden?
2. Ist es sinnvoll Zellgruppen des Hoechstprofils vor dem FACS Sort anhand ihres Oberflächenantigenexpressionsmusters mittels MACS anzureichern?
3. Welche Fluoreszenzintensitäten weisen die Oberflächenantigene Thy-1,  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit in den unterschiedlichen testikulären Zellpopulationen im Hoechstprofil auf?
4. Kann die Kombination von Oberflächenantigenfluoreszenzmustern und Hoechst 33342-Fluoreszenz-Mustern als Sortierkriterien für eine FACS-Untersuchung genutzt werden, um die 6 Hodenzellpopulationen der Spermatogenese akkurat und prognostisch sicher zu isolieren.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Allgemeine Geräte

Brutschränke	HeraCell 150 Heraeus, Hanau, Germany
Cleanworkbench	Herasafe Heraeus, Hanau, Germany
Invertoskope	Diaphot 300, Nikon; Düsseldorf, Germany
Pipetten 10/100/1000µl	HERAUS; Hanau, Germany
GFL Schüttelwasserbad 1086	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Germany
MACS-Zubehör	MACS <sup>®</sup> MultiStand & MiniMACS <sup>™</sup> Separation Unit, Miltenyi Biotec GmbH; Bergisch Gladbach, Germany
MoFlo Cellsorter	DakoCytomotion Inc., Fort Collins, CO, USA
Tischzentrifuge	Biofuge primo, HERAUS, Hanau, Germany
Scanner	DX 4400 EPSON; Japan
Thermoblock	KTMR-133, HLC-Biotech, Bovenden
Tischzentrifuge	Biofuge primo, HERAUS, Hanau, Germany
PCR- Block PTC-100	Programmable Thermal Controller; MJ, Research Inc.; Waltham, MA, USA
PCR- Block PTC-200	Pettier Thermal Cyclers ; MJ, Research Inc. ; Waltham, MA, USA
Gel Kammer	PHARMACIA Gel Elektrophoresis Apparate; Erlangen, Germany
Vortex-Schüttler	IKA <sup>®</sup> Vortex3, Staufen, Germany

##### 3.1.2. Computerprogramme

Auswertung der Agarosegele	GelScan 3D Free Edition V2.5,1997, BioSicTec, Marburg, Germany
Auswertung der FACS-Daten	FlowJo 8.8.3, Tree Star Inc; Ashland, Oregon, USA

Tabellenkalkulation	Microsoft Excel <sup>®</sup> , Version 2008 für Mac, Microsoft, Seattle, USA,
Textverarbeitung	Microsoft Word <sup>®</sup> , Version 2008 für Mac Microsoft, Seattle, USA

### **3.1.3. Chemikalien und Reagenzien**

Alle Materialien und Reagenzien, die von den Standard-Materialien abweichen, wurden von den folgenden Firmen bezogen BD Pharmigen, Franklin Lakes, NJ USA; Caltag, Buckingham, United Kingdom; Eppendorf, Hamburg, Germany; GIBCO, Darmstadt, Germany; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany; PAA LABORATORIES, Cölbe, Germany; Promega, Mannheim, Germany; QIAGEN, Hilden, Germany; SIGMA-Aldrich, Taufkirchen, Germany. Die verwendeten Materialien sind nachfolgend gesondert in der Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2 : Verwendete Materialien mit Bestellnummer und Herstellerfirmen**

<b>Materialien</b>	<b>Herstellerfirmen</b>	<b>Bestellnummern</b>
A-6-integrin (CD 49f)	Caltag	M49FF-02MG
Anti-FITC-microbeads	Miltenyi Biotec	130-048-701
Anti-Thy-1-microbeads(CD 90.2)	Miltenyi Biotec	130-049-101
Anti-c-Kit-microbeads	Miltenyi Biotec	130-091-224
c-Kit (CD117)	BD Pharmigen	553869
Collagenase A	SIGMA-Aldrich	C0130
DMEM-Zellkulturmedium	GIBCO	41966
DNase I	SIGMA-Aldrich	AMPD1
dNTPs	Promega	U1511
FACS Probenröhrchen 5ml	BD Bioscience	352052
Foetales Rinder Serum	PAA LABORATORIES	A14-151
HBSS	SIGMA-Aldrich	H6648
Hoechst 33342	SIGMA-Aldrich	B-2261
Loading Buffer	SIGMA-Aldrich	B-8026
M-MLV RT Puffer (5x)	Promega	M5313
M-MLV RT	Promega	M1701
Oligo-dT <sub>15</sub> -Primer	Promega	C1101
Pipettenspitze bis 1000µl	Eppendorf	0030 000.919
Pipettenspitze bis 200µl	Eppendorf	0030 000.870
Pipettenspitze bis 20µl	Eppendorf	0030 000.838
Probenröhrchen 50ml	BD Bioscience	352073
Probenröhrchen 15ml	BD Bioscience	352097
Propidiumiodid	SIGMA-Aldrich	P4864
RNAasin <sup>®</sup>	Promega	N2511
Taq-Polymerase	QIAGEN	201203
Thy-1(CD 90.2)	Caltag	MM2005
Zellsieb Pore 40um	BD Bioscience	352340
Zellsieb Pore 70um	BD Bioscience	352350
Verapamil	SIGMA-Aldrich	V4629

### 3.1.4. Puffer und Lösungen

#### Erythrozytenlysepuffer 10x

0,154 M NH<sub>4</sub>Cl;  
0,01 M KHCO<sub>3</sub>;  
0,1 mM EDTA, pH 7,3

#### PBS: 10x Stammlösung

80 g NaCl (58,44 g/mol)  
2 g KCl (74,55 g/mol)  
14,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (137,99 g/mol)  
2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (136,09 g/mol)  
auf 1Liter auffüllen, pH 7,4

#### TBE: 5x Lösung

54 g Tris  
27,5 g Borsäure  
20 ml 0,5 M EDTA pH 8.0  
auf 1Liter H<sub>2</sub>O

#### BSA 10 % :

50 ml PBS /Tween  
5 g BSA  
0,005 g Natriumazid (NaN<sub>3</sub>)

#### HHBSS- Puffer:

8,006 g NaCl(74,44g/mol)  
403 g KCl(74,55g/mol)  
0,101 g MgSO<sub>4</sub>(120.37g/mol)  
0,10 g MgCl<sub>2</sub>(95,21g/mol)  
0,060 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(136,09g/mol)  
0,114 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (141,96g/mol)  
4,766 g HEPES  
auf 1Liter Aqua dest.

#### PCR Laufpuffer

200 ml 5x TBE auf 1 Liter H<sub>2</sub>O

#### HS-Puffer:

5 ml HS-Puffer Gebrauchslösung  
0,0063 g NaHCO<sub>3</sub> (84,01 g/mol)  
0,025 g Bovines Serum Albumin

### 3.1.5. Fluorochrome

Die Fluorochrome, die für die FACS genutzt wurden sind in Tabelle 3 aufgelistet. Der Tabelle sind spezifische Exzitations- und Emissionswellenlänge, sowie die Farbe des verwendeten Lasers zu entnehmen.

**Tabelle 3: Spezifische Eigenschaften der genutzten Fluorochrome.** Die Angaben zu Excitation und Emission entsprechen den Herstellerangaben von Caltag, BD Pharmigen, und SIGMA-Aldrich. **APC**= Allophycocyanin; **FITC**= Fluorescein isothiocyanat; **PE**= Phycoerythrin; **PI**= Propidiumiodid

Fluochrom	Excitation	Emission	Laser
APC	633	660	rot
FITC	488	517	grün
Hoechst 33342	350	461	ultra-violett
PE	488	575	blau
PI	535	617	rot

### 3.1.6. Primer

Die Primer für die PCR-Methoden wurden von der Firma MWG, Hölle und Hüttner AG, Tübingen, Germany bezogen. Für die Untersuchung mittels RT-PCR wurden Primer verwendet, die bereits von anderen Arbeitsgruppen genutzt wurden, um Hodenzellen mittels PCR zu untersuchen (ABCG2; Zhou 2001) (ABCG2, c-Kit, CREM- $\tau$ ,  $\beta$ -actin; Lassalle 2004) (Catsper 1; Ren 2001, James 2004).

In Tabelle 4 sind die jeweiligen Primer für die untersuchten Gene aufgeführt:

**Tabelle 4: Primer für die semiquantitative RT-PCR**

Gen	Primer 5'-3'	Primer 3'-5'
ABCG2	CCATAGCCACAGGCCAAAGT	GGGCCACATGATTCTTCCAC
c-Kit	AATGGAAGGTTGTCGAGGA	CAAATCATCCAGGTCCAGAG
Catsper 1	TAGACCCAAGCCATCAATCC	CCATGCTGTTGGTATGGTTG
CREM- $\tau$	TGCCTGGTATTCCAAGATTG	CGGCTGATTGTGCTGCATA
$\beta$ -actin	TCGTGCGTGACATCAAAGAGA	GAACCGCTCGTTGCCAATAGT



## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Versuchsaufbau

Zur Erarbeitung der Fragestellungen wurde das folgende Protokoll aufgestellt:

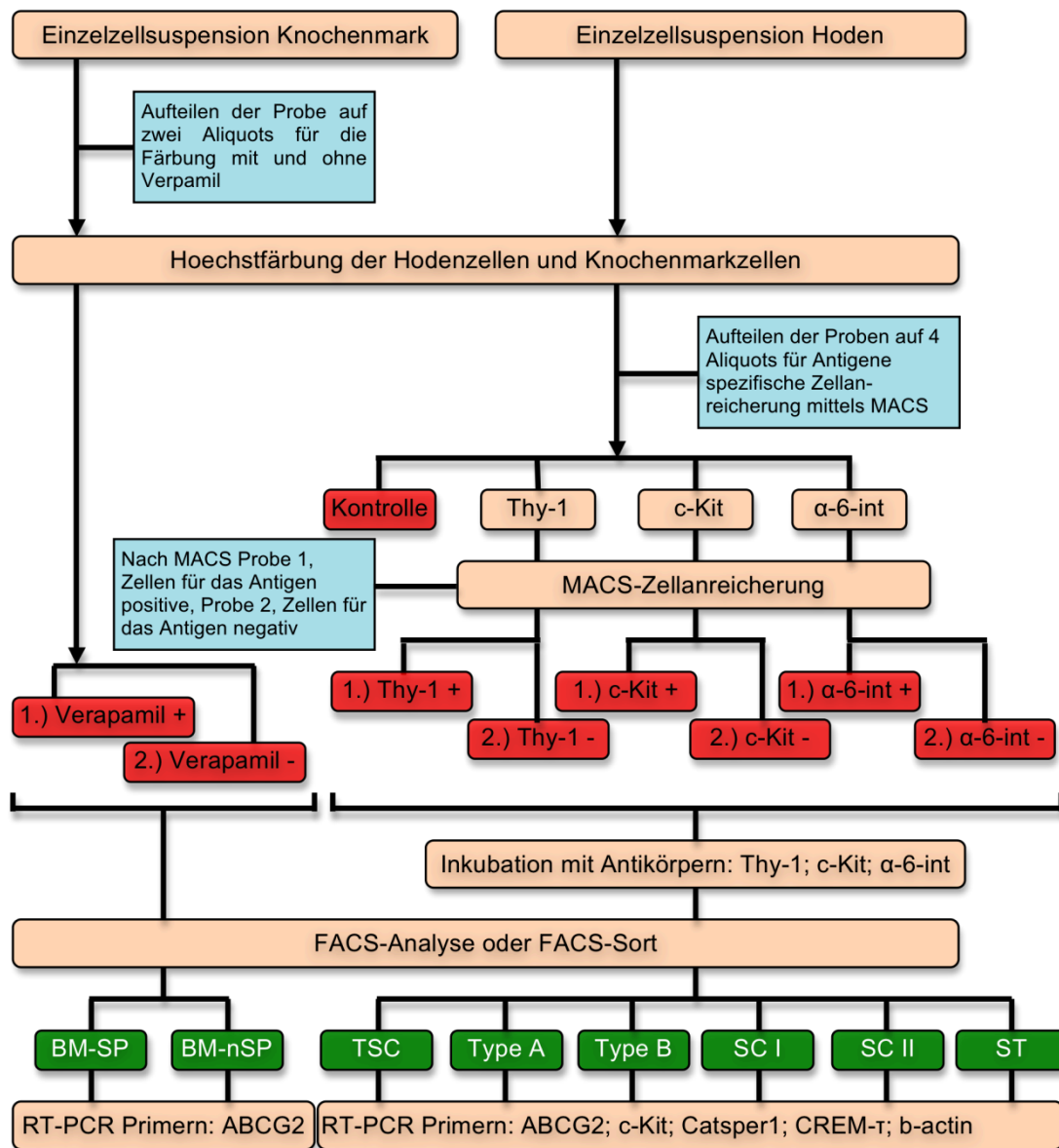


Abbildung 3: Schematisiertes Protokoll

Die Einzelzellensuspensionen des Knochenmarks und Hodens sind der Ausgangspunkt des oben schematisch abgebildeten Protokolls. Die Versuchstierpräparation und Herstellung der Einzelzellensuspension ist im weiteren Verlauf beschrieben. Das Knochenmark wurde bei jedem Versuch mitbehandelt und diente der internen Kontrolle, erstens bei der Hoechstfärbung, zweitens bei der FACS-Analyse und dem

FACS-Sort und drittens bei der semiquantitativen RT-PCR. Die Zellsuspension des Knochenmarks wurde für die Färbung mit Hoechst 33342 (unten beschrieben) auf zwei Proben aufgeteilt. Einer Knochenmarkprobe wurde für die Hoechstfärbung Verapamil (Verapamil +) beigefügt, die andere Probe blieb unbehandelt (Verapamil-). Für alle Proben erfolgte die Inkubation mit Hoechst 33342. Anschließend wurden die Proben des Knochenmarks, Verapamil + und Verapamil – für die weitere Untersuchung mittels FACS vorbereitet und bei 4°C aufbewahrt. Die Hodenzellsuspension wurde auf vier Proben aufgeteilt. Eine Probe blieb unbehandelt und wurde ebenfalls bis zur FACS-Untersuchung bei 4°C aufbewahrt (Kontrolle). Für je eine der drei anderen Proben erfolgte die Anreicherung für jeweils ein Antigen (Thy-1; c-Kit;  $\alpha$ -6-integrin) mittels MACS. Nach der Anreicherung erhielt man pro Antigen zwei Proben. Die positiven Proben (Thy-1+; c-Kit+;  $\alpha$ -6-integrin+) enthielten Zellen, die das jeweilige Antigen exprimierten und die negativen Proben (Thy-1-; c-Kit-;  $\alpha$ -6-integrin-) enthielten Zellen, die das Antigen nicht exprimierten. Insgesamt entstanden sechs Proben, die mit Antikörpern inkubiert wurden, an die ein Fluorchrom gekoppelt war, so dass sie für die FACS-Analyse bzw. den FACS-Sort zur Verfügung standen.

Die Verapamil + Probe diente als interne Kontrolle bei der Hoechstfärbung des Knochenmarks. Verapamil blockiert den ABCG2 Transporter, so dass es den BM-SP Zellen nicht möglich war Hoechst 33342 aktiv aus der Zelle zu transportieren und bei der FACS-Analyse dieser Probe keine SP-Region zu erkennen war. Trat bei der FACS-Analyse der Verapamil-Probe eine SP auf, konnte man davon ausgehen, dass es sich dabei um Zellen handelt, die den ABCG2 Transporter exprimieren, so dass sie Hoechst 33342 aktiv aus dem Zelllumen hinaus transportieren können. Beim FACS-Sort wurden aus der Verapamil-Probe BM-SP und BM-nSP Zellen sortiert, die für die RT-PCR als positive Kontrolle der ABCG2-Expression genutzt wurden.

Aus der Hodenzellsuspension einschließlich TSC, Type A, Type B, SC I, SC II und ST wurden nach Hoechstfärbung, Zellanreicherung mittels MACS und der Markierung von Oberflächenantigenen im FACS-Sort sechs distinkte Hodenzellpopulationen separiert. Um die im Hoechstprofil ähnlich erscheinenden Zellgruppen strikt voneinander trennen und detailliert charakterisieren zu können erfolgte eine Markierung der unterschiedlichen Zell-Oberflächenantigene. Durch eine Voranreicherung mittels MACS war es möglich Zellen vor zu sortieren, die nur in einer geringen Anzahl in der Zellsuspension vorhanden waren.

Die nach festgelegten Kriterien sortierten Hodenzellpopulationen, bestehend aus Hoechst- und Antikörperfluoreszenz wurden in einem zweiten Analyseschritt auf Genexpressionsebene untersucht. Mittels RT-PCR wurde überprüft, ob

Spermatogenesestadien-spezifische Gene der Hodenzellpopulationen TSC, Type A, Type B, SC I, SC II und ST in den aussortierten Zellgruppen nachweisbar waren. Dieser Nachweis mittels RT-PCR diente zur Kontrolle, ob die ausgewählten Sortierparameter einer Überprüfung auf Genexpressionsebene standhalten.

### **3.2.2. Allgemeine Vorbemerkung**

Alle Versuche wurden in einer chronologischen Abfolge von definierten Arbeitsschritten durchgeführt, um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Für die Untersuchung der Hodenzellen wurden in dieser Arbeit zwei Analysemethoden verwendet: Durchflusszytometrie (FACS) und semiquantitative RT-PCR. Das folgende Schema dient zur Orientierung, bei der Beschreibung der jeweiligen Versuchsabläufe.

### **3.2.3. Beschreibung allgemeiner Arbeitsabläufe**

Während der Versuchsdurchführung wurden folgende Arbeitsschritte wiederholt angewendet:

#### **3.2.3.1. Zentrifugieren**

Das Probenröhrchen mit der darin enthaltenen Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 300 rpm in eine Zentrifuge eingesetzt. Nach dieser Zeit hatten sich die Zellen am Boden des Röhrchens abgesetzt und der Flüssigkeitsüberstand konnte abgenommen werden.

#### **3.2.3.2. Waschen**

Das Waschen ist ein nötiger Zwischenschritt, um Reste von Reagenzien, wie z.B. Kollagenase, DNase und Antikörper-Konjugate (AK-Konjugate) zu eliminieren oder beim Wechseln des Nährmediums einer Zellsuspension. Dafür wurde die Zellsuspension bzw. Probe zunächst zentrifugiert, dann wurde der Flüssigkeitsüberstand verworfen und das am Boden des Probenröhrchens verbliebene Pellet gelockert. Um das Pellet wieder zu lockern wurde das Probenröhrchen auf einen Vortexschüttler gehalten. Das Pellet wurde in 3-5 ml des Nährmediums Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM+) oder Phosphate Buffered Saline (PBS+) resuspendiert und gleichmäßig durchmischt. Danach wurde die Probe erneut zentrifugiert, der Überstand wieder verworfen und das Pellet wie oben beschrieben gelockert, so dass die Probe für weitere Versuchsschritte verwendet werden konnte.

### 3.2.3.3. Zellzahlbestimmung

Aus der Zellsuspension wurden zunächst 100  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 10  $\mu\text{l}$  Methylenblau versetzt, so dass sich alle Zellen mit defekter Membran blau anfärbten. Die Zellsuspension wurde in die vorbereitete Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden alle nicht blau gefärbten Zellen ausgezählt die im Mittelquadrat der Zählkammer lagen, welches aus 16 Kleinquadraten besteht. Ein Kleinquadrat hatte eine Fläche von  $0,0625 \text{ mm}^2$  und eine Kammertiefe von 0,1 mm. Daraus ergibt sich ein Volumen von  $0,00625 \text{ mm}^3$ . Somit hatte das aus 16 Kleinquadraten bestehende, Großquadrat ein Volumen von  $0,1 \text{ mm}^3$  entsprechend  $1 \mu\text{l}$ . Die in einer Großkammer gezählten Zellen entsprachen der Größe  $n$ . Unter Einbeziehung des Faktors 1000 erhielt man die Anzahl der lebenden Zellen in 1 ml Zellsuspension. Durch Multiplikation der Zellzahl mit der Volumenmenge in ml, ergab sich die Gesamtanzahl der vitalen Zellen in einer Probe.

Isolierte Zellen =  $n \times 1000 \times \text{Volumenmenge [ml]}$

Formel 1

### 3.2.4. Tierpräparation

In dieser Arbeit wurden 3 bis 8 Monate alte, männliche C57/BL6 Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden durch  $\text{CO}_2$ -Asphyxiation und anschließende zervikale Dislokation getötet. Die Euthanasierung der Tiere wurde entsprechend der Tierschutzbestimmungen der Universität des Saarlandes und der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Das Versuchstier wurde mit Alkohol abgewaschen. Das Fell des euthanasierten Tieres wurde mit Alkohol aus einer Kunststoffspritzflasche abgespült und grob getrocknet. Anschließend wurde das Versuchstier auf einer Styroporunterlage fixiert. Das Fell wurde auf der Bauchseite im Bereich der Hinterläufe leicht angehoben und eingeschnitten. Danach wurde das Fell V-förmig abpräpariert. Anschließend erfolgte die Eröffnung von Thorax und Abdomen. Über die Aorta thoracica descendens erfolgte eine Spülung mit 10 ml PBS. Diese PBS-Spülung diente der Ausschwämmung von Erythrozyten aus dem Gefäßsystem und reduzierte die Verunreinigung der Zellproben mit Erythrozyten. Danach wurden die Hoden und die Oberschenkelknochen schonend heraus präpariert. Dazu wurden die Hoden über die Bauchfaszien angehoben und vom Nebenhoden separiert. Oberschenkelknochen wurden durch Lösen der Muskulatur und Sehnen vom Torso und Trennung an Hüft und Kniegelenk entnommen. Bis zur mechanisch-enzymatischen Aufbereitung wurden die Organe in DMEM+ bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### **3.2.5. Hodenaufbereitung**

Nach der Hodenentnahme wurden die Hoden mechanisch-enzymatisch verdaut. Durch Inzision der Tunica albuginea konnten die Tubuli seminiferi vorsichtig über den kleinen Einschnitt in der Hodenhülle herausgedrückt werden und in einer Petrischale (Durchmesser 60 mm; Höhe 12mm) mit ca. 3 ml DMEM+ gesammelt werden. Die Tubuli seminiferi wurden mit einem Skalpell grob zerkleinert, um viele Endstücke zu erhalten, an denen die Zellen aus dem Zellverband gelöst werden können. Die Gewebestücke wurden in einem Volumen von 10 ml DMEM+ aufgenommen. Zur Probe wurden 100 µl Kollagenase A hinzugefügt. Anschließend wurde sie für 10 min in ein 32°C warmes Wasserbad mit Bewegungsplatte gestellt, die sich mit einer Frequenz von 120 Bewegungen pro Minute hin und her bewegte, um das Sedimentieren der Zellen zu vermeiden. Danach wurden die Zellen gewaschen und der gesamte Vorgang einschließlich des Waschens einmalig wiederholt. Abschließend wurde die Probe mit einem Zellsieb gefiltert, das eine Porengröße von 40 µm hatte, um heraus gelöste Zellen von den groben Gewebetrümmern zu reinigen.

### **3.2.6. Knochenmarkpräparation**

Das ausgelöste Os femorale wurde von Muskulatur und Sehnen befreit und der Markraum des Röhrenknochens am oberen und unteren Ende eröffnet. Der Markraum, in dem sich die hämatopoetischen Zellen befinden, wurde mit 3 ml DMEM durchgespült. Dazu wurde die Spülkanüle in den eröffneten Markraum eingeführt und die 3 ml DMEM durch den Röhrenknochen gepresst. Anschließend erfolgte die Erythrozytenlyse, wie unter Punkt 3.2.7 beschrieben, nach deren Abschluss die Zellen in 10 ml DMEM für das Zählen resuspendiert wurden.

### **3.2.7. Erythrozytenlyse**

Der Vorgang der Erythrozytenlyse beruht auf dem allgemeinen Prinzip Stoffmengen durch die Erythrozytenmembran zu bewegen, hierfür kann z. B. Ammoniumchlorid verwendet werden. Dies führt zum Aufquellen des Erythrozyten und zur Schädigung der Erythrozytenmembran, was dann schließlich die Zerstörung des Erythrozyten zur Folge hat.

Für den Erythrozytenlysevorgang wurden die aus Hoden und Knochenmark gewonnenen Zellen, nach dem oben beschriebenen Verdau, in 1 ml PBS resuspendiert. Der für jeden Versuchstag frisch angesetzte Erythrozytenlysepuffer, wurde aus einem zehnfach konzentrierten Erythrozytenlysepuffer und PBS hergestellt. Das Verhältnis von Konzentrat zu PBS beträgt 1:9. Zur Zellsuspension, die in 1ml

Volumen PBS gelöst war, wurden 4ml Erythrozytenlysepuffer zugegeben. Dann wurde die Probe für 5 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut gewaschen und in 10ml DMEM+ resuspendiert. Nach der Waschung und Resuspension waren die gewonnenen Zellproben aus Hoden und Knochenmark soweit vorbereitet, dass sie in die weiteren Versuchsschritte überführt werden konnten.

### 3.2.8. Hoechst 33342-Färbung

Um eine Hoechstfärbung durchführen zu können, müssen die vorbereiteten Zellen aus den Hoden- und Knochenmarkzellsuspensionen gezählt werden. Nachdem die Zellen gezählt wurden, wurde die Konzentration der Zellsuspension auf  $10^6$ /ml eingestellt. Zur Einstellung der Zellkonzentration wurde vorgewärmtes DMEM+ genutzt, das im Folgenden beschrieben ist. Für Hodenzellen wurde DMEM auf 32°C und für Knochenmarkzellen auf 37°C vortemperiert. Das Hoechst 33342 stand in einer Konzentration von 1 mg/ml als Lösung zur Verfügung. Zu je  $10^6$  Zellen wurden 5 µg Hoechst 33342 zugegeben, so dass eine 200fach verdünnte Hoechstkonzentration entstand. Anhand der nachfolgenden Formel wurde das Volumen des Vitalfarbstoffs Hoechst 33342 berechnet, welches zu den jeweiligen Proben zugegeben wurde.

$$\text{Gesamtvolumen [ml]} \times 1000 / 200 = \text{Volumen Hoechst 33342 [\mu l]} \quad \text{Formel 2}$$

Um eine Hoechstfärbung durchzuführen, wurde der Probe 50 µl DNase zugegeben, um das Binden von Hoechst an freie DNA aus lysierten Zellen zu vermeiden. Die Färbung erfolgte im Wasserbad mit Bewegungsplatte, die sich mit einer Frequenz von 120 pro Minute hin und her bewegte, um das Sedimentieren der Zellen zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte für 90 Minuten bei 32 °C für den Hoden und 37 °C für das Knochenmark.

Nach der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert und zweimal mit 4°C kaltem DMEM gewaschen, um den aktiven Export von Hoechst 33342 durch die ABC-Transporter zu stoppen und das Hoechst 33342 durch starke Verdünnung aus der Probe zu entfernen. Nach dem zweiten Waschen wurden die Zellen in HBSS resuspendiert.

### 3.2.9. Markierung von Oberflächenantigenen mit Antikörpern

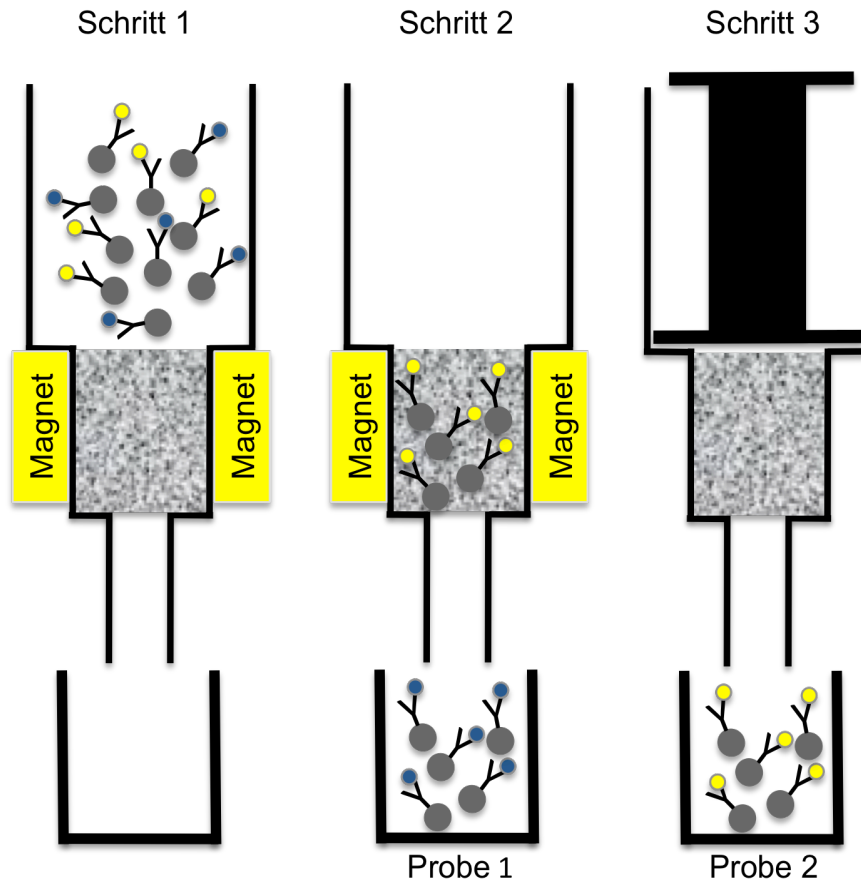
Das Sortieren der Zellen in homogene Zellpopulationen erfolgte erstens durch Charakterisierung der Hoechstfluoreszenz und zweitens durch Charakterisierung der präsentierten Zelloberflächenantigene einer Zellpopulation. Hierfür wurden die Zellsuspensionen mit speziellen Antikörpern inkubiert. In dieser Arbeit wurden

Antikörper gegen 3 verschiedene Antigene verwendet: Anti-Thy-1, Anti-c-Kit und Anti- $\alpha$ -6-integrin.

Bei der Synthetisierung der Antikörper ist es möglich, zusätzlich ein Fluorchrom oder ein kleines magnetisches Teilchen (MicroBead) oder beides an den Antikörper zu koppeln. Die Kombination aus Antikörper und MicroBead ermöglicht, spezifische Oberflächenantigene der Zelle zu markieren und mittels magnetischer Zellauswahl Magnetic Cell Sorting (MACS) Zellen aus einer Zellsuspension anzureichern. Die Kombination aus Antikörper und Fluorchrom ermöglicht, spezifische Oberflächenantigene der Zelle zu markieren und mittels Durchflusszytometrie anhand einer spezifischen Emissionswellenlänge des Fluorchroms zu detektieren.

#### **3.2.9.1. Zellanreicherung mittels MACS**

In dieser Arbeit wurden Teile der Hodenzellsuspensionen anhand der ausgewählten Oberflächenantigene  $\alpha$ -6-integrin, c-Kit und Thy-1 angereichert und vorsortiert. Für die Zellanreicherung wurden die Zellen nach der Hoechstfärbung in 80  $\mu$ l HBSS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde so eingestellt, dass eine Zellkonzentration von  $10^7$  Zellen/80  $\mu$ l HBSS vorlag. Entsprechend den Herstellerangaben wurden je  $10^7$  Zellen zu 20  $\mu$ l der MicroBead-Lösung gegeben. Die MicroBead-Lösung enthielt Antikörper gegen eines der drei genannten Antigene und war sowohl mit einem MicroBead als auch mit einem Fluorchrom markiert. Die Probe wurde für 25 Minuten bei 4°C inkubiert, anschließend gewaschen und in ein Endvolumen von 500  $\mu$ l HBSS resuspendiert. Um die Zellen anhand des magnetisch geladenen MicroBeads anzureichern, wurde die Zellsuspension über eine ferromagnetische Säule laufen gelassen.



**Abbildung 4: Schematischer Ablauf einer MACS Zellanreicherung:** Ablauf einer magnetisch aktivierten Zellsélection: Die Zellsuspension mit spezifisch markierten Zellen wird auf die Säule gegeben (Schritt 1). Nicht markierte Zellen passieren das Magnetfeld und sammeln sich in Probe 1 (Negativ-Fraktion). MicroBead-markierte Zellen bleiben im Magnetfeld hängen (Schritt 2). Die Säule wird aus dem Magnetfeld genommen und die Zellen von der Säule abgespült, so dass Probe 2 MicroBead-markierte Zellen enthält (Positiv-Fraktion) (Schritt 3).

Diese Säule wurde in ein Magnetfeld eingesetzt und mit 500 µl HBSS äquilibriert. Danach wurde die Zellsuspension oberhalb des Magnetfelds auf die Säule gegeben. Die Zellsuspension durchlief langsam das Magnetfeld. Alle Zellen, an deren Membranoberfläche ein MicroBead gebunden war, bleiben im Magnetfeld hängen. Der Rest der Probe durchlief die Säule komplett und wurde in einem Probenröhrchen aufgefangen. Neben den Zellen, die mit einem MicroBead markiert waren, blieben jedoch auch einige nicht markierte Zellen mechanisch in der Säule haften. Um die Zahl dieser Zellen möglichst gering zu halten, wurde die Säule nach dem Durchlaufen der eigentlichen Zellsuspension dreimal mit jeweils 500 µl HBSS nachgespült. Hiernach befanden sich im ersten Probenauffangröhrchen fast ausschließlich Zellen, die nicht MicroBead markiert waren. Diese Zellsuspension wurde daher als Negativ-Fraktion bezeichnet. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und mit 1 ml HBSS durchgespült und ihr Inhalt in einem zweiten Probenröhrchen aufgefangen. Hierbei wurden alle Zellen, die noch mechanisch in der Säule und alle Zellen, die durch die Markierung des MicroBeads im Magnetfeld gehalten wurden, aus der Säule heraus



gespült. Im zweiten Probenröhrchen befanden sich somit hauptsächlich die Zellen, die mit dem MicroBead markiert waren, weshalb die Zellsuspension als Positiv-Fraktion bezeichnet wurde. Abschließend wurden beide Fraktionen zentrifugiert und in je 100 µl PBS resuspendiert.

### **3.2.9.2. Zellinkubation mit Fluorchrom-gekoppelten Antikörpern**

Für die Zellinkubation mit Fluorchrom-gekoppelten Antikörpern wurden die Zellen nach der abgeschlossenen Hoechstfärbung in 100 µl PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde so eingestellt, dass eine Zellkonzentration von  $10^7$  Zellen/100 µl PBS vorlag. Entsprechend den Herstellerangaben wurden je  $10^7$  Zellen zu 2 µl der Antikörperlösung zugegeben. Die Probe wurde für 20 Min bei 4°C inkubiert, anschließend gewaschen und einem Endvolumen von 400 µl HBSS resuspendiert.

### **3.2.10. Allgemeine Grundlagen der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Analysesystem, mit dem Zellen in Suspension einzeln untersucht werden können. Das Prinzip besteht darin, die Zellen einzeln einen Laserstrahl passieren zu lassen und Streuungen des Lichts sowie Fluoreszenzsignale in einem optischen Detektionssystem aufzunehmen. Hierbei können von einer einzelnen Zelle gleichzeitig Zellstruktur und Oberflächenantigen erfasst werden.

#### **3.2.10.1. Zellstruktur**

Die Lichtstreuung wird durch die strukturellen Eigenschaften einer Zelle bestimmt. Passiert die Zelle einen Lichtstrahl, wird dieser in zwei Bereiche abgelenkt. Dabei sind Ablenkungen im Bereich von 0° bis 10° und Ablenkungen um etwa 90° für die Charakterisierung der Zelle von Interesse: Die geringe Lichtstreuung in einem Bereich von 0° bis 10° wird vom Forward Scatter (FSC) aufgenommen und ermöglicht Aussagen über die Größe der Zelle. Die starke Lichtstreuung in einem Bereich von etwa 90° wird vom Side Scatter (SSC) aufgenommen und liefert Informationen über die innere Zellstruktur (Granularität).

#### **3.2.10.2. Fluoreszenz**

Die Fluoreszenz kommt durch eine Lichtemission von Fluorchromen zustande. Diese Moleküle werden durch Licht einer bestimmten Wellenlänge aus ihrem energetischen Grundzustand auf ein höheres Energieniveau gehoben. Fallen sie aus diesem

angeregten Zustand auf das ursprüngliche Energieniveau zurück, wird durch Energiefreisetzung ein Photon ausgesendet, sodass Licht einer größeren Wellenlänge emittiert wird. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet. Jedes Photon kann mit Licht eines definierten Wellenlängenbereiches angeregt werden und emittiert dann ebenfalls Licht eines charakteristischen und höheren Wellenlängenbereiches. Ein Einsatz optischer Filter und Spiegel ermöglicht den simultanen Einsatz verschiedener Fluorochrome.

### **3.2.10.3. Analyseprinzip der Durchflusszytometrie**

Die mit Hoechst gefärbte und mit Antikörpern inkubierte Zellsuspension wurde im Probenröhrchen in eine Messküvette gestellt, welche unter Überdruck stand. Über eine Kapillare wurde die Zellsuspension in einen Flüssigkeitsstrom eingeleitet, der bei laufendem Analysegerätgerät die Messkammer kontinuierlich passierte. Zur Messkammer hin verjüngte sich der Flüssigkeitsstrom, so dass am Analysepunkt, der Kreuzungsstelle von Lichtstrahl und Flüssigkeitsstrom, eine Betrachtung von einzelnen Zellen möglich war.

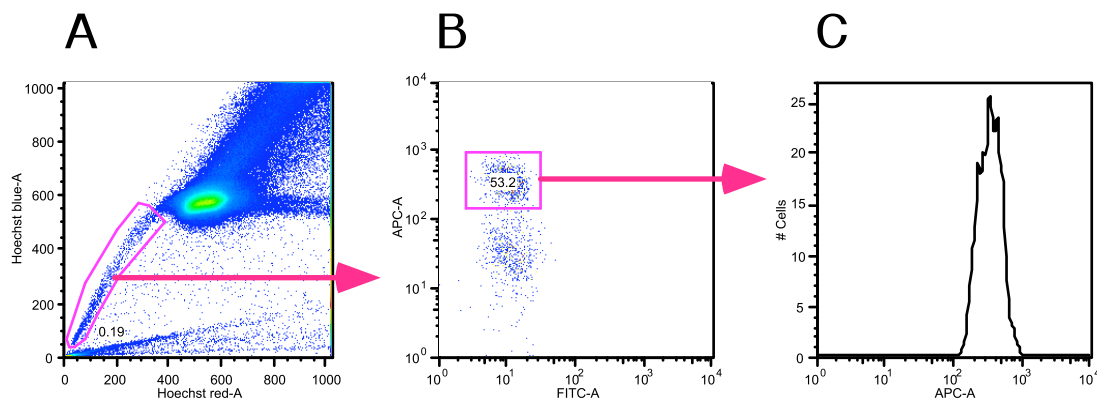
### **3.2.10.4. Durchflusszytometrie**

Ziel dieser Analyse war es, jede einzelne Zelle hinsichtlich diverser Parameter, wie Antigenexpression, Ploidietät, Zellgröße und Granularität genau zu untersuchen. Bevor eine Probe mittels Durchflusszytometrie untersucht werden konnte, muss zuerst das FACS-Gerät kalibriert werden. Bei der Untersuchung verschiedener Antigenexpressionen kamen unterschiedliche Fluorochrome zum Einsatz, was zu einer Überlagerung der Fluoreszenzspektren führen kann. Diese Überlagerung wurde mittels optischer Filter, Einstellen der Signalverarbeitung und Kompensation während der Informationsverarbeitung im Computer korrigiert. Eine erneute Justierung der Geräteeinstellung war bei jeder Messung notwendig.

### **3.2.11. Darstellung der Messergebnisse**

Die aufgenommenen FACS-Daten konnten direkt weiter verarbeitet und als Datei für eine spätere Auswertung gespeichert werden. Die gleichzeitige Detektion verschiedener Signale, wie zum Beispiel FSC, SSC und Fluoreszenz verschiedener Fluorochrome ermöglichte eine Auswertung der Daten hinsichtlich unterschiedlicher Fragestellungen. Die Messdaten wurden meist in der Form eines Zytogramms dargestellt. Im Zytogramm wurden zwei detektierte Zelleigenschaften im Verhältnis

zueinander abgebildet. Jede Zelle wurde als Punkt entsprechend der aufgenommenen Eigenschaften an einer bestimmten Position im Zytogramm abgebildet. Deswegen wurde diese Form der Darstellung auch als Dotplot-Diagramm bezeichnet. Eine weitere Möglichkeit aufgenommene Daten darzustellen bot das Histogramm. Im Histogramm wurde eine Zelleigenschaft betrachtet. Dabei wurde die Zelleigenschaft auf der Abszisse abgebildet und die Zellanzahl auf der Ordinate. Ein Histogramm konnte zeigen, wie viele Zellen mit welcher Häufigkeit ein Zellmerkmal aufweisen, wobei die Intensität des detektierten Signals einen Rückschluss auf die Häufigkeit der Ausprägung zuließ. Bei der Auswertung und Verarbeitung detektierter Daten war es entscheidend, bestimmte Bereiche eines Zytogramms oder Histogramms deutlich abzugrenzen. Denn jeder Bereich innerhalb eines Zytogramms oder Histogramms stellte ausgeprägte Zellmerkmale unterschiedlicher Intensität dar. Dieses Festlegen bestimmter Bereiche wurde als Gating bezeichnet und ermöglichte die optimale Differenzierung ausgewählter Zellen, so dass Zellgruppen auf weitere Merkmale hin untersucht oder Bereiche festgelegt werden konnten, in denen Zellen gewünschte Eigenschaften aufwiesen, um sie aus der Zellsuspension zu sortieren.



**Abbildung 5: Gating, Histogramm und Zytogramm:** **A:** Hoechst 33342-gefärbte Knochenmarkzellen in einem Zytogramm in der Darstellung Hoechst blue und Hoechst red. Das Gate markiert die Side Population (SP). **B:** Die Zellen aus der SP in Abb. A sind in einem Zytogramm anhand ihrer Fluoreszenzsignale für APC und FITC abgebildet. Zellen mit einer hohen Fluoreszenzintensität für APC sind mit einem Gate markiert **C:** Zellen aus dem in Abb. B markierten Gate sind in einem Histogramm abgebildet, das die Zellzahl der Signalintensität für APC gegenüberstellt.

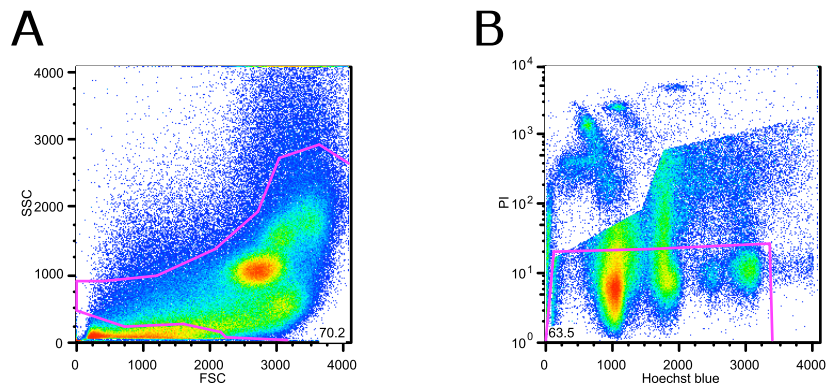
### 3.2.12. Fluoreszenzgesteuerte Zellsortierung

Die Fluoreszenzgesteuerte Zellsortierung basiert auf den gleichen Prinzipien wie die Durchflusszytometrie. Sie ermöglicht, Zellen nach bestimmten Parametern wie Zellmorphologie, DNA-Gehalt oder Antigenexpression zu sortieren. Das Sortieren von Zellen mittels FACS ist das beste Beispiel für eine Echtzeitanalyse, denn hier wurden die Zellen hinsichtlich der oben genannten Eigenschaften untersucht und es wurde festgelegt, welche Charakteristika eine Zelle aufweisen musste, damit sie aus der

Zellsuspension separiert wurde. Nach der Passage einer Zelle des Analysepunktes wurde jeder Tropfen, der eine Zelle enthält elektrisch aufgeladen. Die positive und negative Ladung des Tropfens diente dazu, den Tropfen mittels eines Spannungsfeldes nach links oder rechts abzulenken, so dass reine Zellfraktionen in jeweils ein Auffangröhrchen sortiert wurden. Das positive oder negative Aufladen des Tropfens mit der darin enthaltenen Zelle war davon abhängig, welche Sortiermerkmale für Probenröhrchen festgelegt wurden. Die Zellsortierung erfolgte durch einen Hochgeschwindigkeits-Zellsortierer, MoFlo Cellsorter (DakoCytomotion Inc., Fort Collins; CO; USA). Der MoFlo Cellsorter ist in der Lage nach festgelegten Kriterien zwei separate Zellpopulationen zu sortieren. Diese Einschränkung, die das Sortieren von nur zwei Zellpopulationen gleichzeitig ermöglicht, hatte einen Einfluss auf das Sortierprotokoll der Hodenzellpopulationen.

### **3.2.13. FACS (-Messung)**

Bevor die Zellen aus der Zellsuspension analysiert werden konnten, wurde vor der Messung Propidiumiodid (PI) zur Probe gegeben. PI ist ein Farbstoff der mittels Durchflusszytometrie detektiert werden kann. Er bindet spezifisch an Nukleinsäuren. Dies wurde genutzt um apoptotische und toten Zellen von vitalen Zellen zu trennen. Die Bindung an Nukleinsäuren ist nur möglich, wenn die perforierte Zellmembran von sterbenden oder toten Zellen eine Färbung mit PI zulässt. Die intakte Zellmembran lebender Zellen kann nicht von PI durchdrungen werden. In der zu messenden Probe wurde eine PI-Konzentration von 2 µg/ml Probenvolumen eingestellt. Die Reduktion zellulärer Trümmer, sowie die Bereinigung der Probe von apoptotischen und Zellen ist Grundvoraussetzung für eine genaue Untersuchung und den Erhalt aussagekräftiger Ergebnisse. Nachfolgend sind die ersten beiden Schritte der FACS-Analyse dargestellt.



**Abbildung 6: Voranalyse der Proben:** Abb. A und B zeigen die Gatingstrategie, die für jede Probe bei der FACS-Analyse vorgenommen wird, um Erythrozyten, tote Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. **A:** Darstellung der Hodenzellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC). Durch das Gate werden Erythrozyten und Zelltrümmer, die sich am unteren Rand der X-Achse befinden ausgeschlossen. **B:** Zellen, die im Gate der Abb. A enthalten sind, werden in der Darstellung PI gegen Hoechst blue betrachtet. Das Gate in Abb. B enthält vitale Zellen, so dass apoptotisch und tote Zellen aus der Probe ausgeschlossen werden. Zellen im Gate der Abb. B werden für die weiteren durchflusszytometrischen Untersuchungen verwendet.

In der Darstellung von SSC gegen FSC wurden Zelltrümmer und noch vorhandene Erythrozyten anhand ihrer geringen Größe identifiziert und aus dem Gatingbereich ausgeschlossen. Der Bereich, in dem die Zellen abgebildet wurden, wurde für die weitere Untersuchung markiert. Die darin enthaltenen Zellen wurden dann hinsichtlich einer Lebend-Tot-Unterscheidung untersucht. Dazu wurden die Zellen in einer Abbildung Hoechst blue gegen PI dargestellt, die es ermöglichte, lebende von apoptotischen und toten Zellen zu trennen. Zellen aus dem Lebend-Gate konnten in der FACS-Analyse weiter untersucht werden.

### 3.2.14. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Methodik der Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) stellt die Möglichkeit dar, die exprimierte Gene einer Zelle zu untersuchen. Der Nachweis für die Transkription eines Gens erfolgte durch die Untersuchung von RNA. Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden spezifische DNA-Polymerasen verwendet, die nicht in der Lage sind RNA zu amplifizieren, was bedeutet, dass die RNA-Sequenz zuerst in eine Komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) umgeschrieben werden musste. Hierfür wurde Reverse Transkriptase (RT) eingesetzt, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe RNA in cDNA umgeschrieben wird. Die cDNA war das Ausgangsmaterial für die sich anschließende PCR, um spezifische Sequenzen zu amplifizieren. Dieses RT-PCR-Verfahren wurde hier genutzt, um die Genexpression der isolierten Zellgruppen (Hoden-SP-Zellen und Zellen der Gruppen 1 bis 5) zu untersuchen, wie in Abbildung 7 dargestellt.

### 3.2.14.1. Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

Wie oben beschrieben, ist es durch die reverse Transkription möglich die Genexpression auf Transkriptionsebene nachzuweisen. Durch das Enzym Reverse Transkriptase wurde aus mRNA einzelsträngige cDNA hergestellt, um spezifische Sequenzen des Untersuchungsmaterials zu amplifizieren. Mit Hilfe des AMOC-Verfahrens (*arithmetic multiplication of cDNA*) war es möglich nach der reversen Transkription eine deutlich höhere Ausbeute von cDNA zu erlangen (Mangan 1993).

Zur Herstellung der cDNA wurde pro Probe die mRNA von 50-100 Zellen einer Probe umgeschrieben. Der Reaktionsansatz einer jeden Probe wurde in einem Eppendorf-Cup zusammengestellt und enthielt 2µl Oligo-dT<sub>15</sub>-Primer, 4µl dNTPs, 1µl Zellsuspensionäquivalent und wurde mit H<sub>2</sub>O auf 20µl aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe für 10 Min. bei 70°C inkubiert und danach bei 4°C aufbewahrt. Jeder Probe wurden 20µl des vorbereiteten Supermixes für die Umschreibung in cDNA zugegeben. Der Supermix setzte sich wie folgt zusammen:

1. 8µl M-MLV 5x Puffer
2. 1µl RNAsin<sup>®</sup>
3. 2µl Nukleotide
4. 8 (8,5)µl H<sub>2</sub>O
5. 1 (0,5)µl M-MLV Reverse Transkriptase

Die M-MLV Reverse Transkriptase wurde erst während der Umschreibung zu den Proben zugegeben (siehe unten). Im Thermocycler erfolgte die Umschreibung der Proben nach dem AMOC-Verfahren nach dem unten aufgeführten Ablauf:

1. 10 min. bei 70°C inkubieren
2. 3 min. bei 95°C inkubieren
3. 3 min. auf Eis legen
4. jeweils 1µl M-MLV RT zu der Probe zugeben (siehe oben)
5. 30 min. bei 37°C inkubieren
6. 10 min. bei 70°C inkubieren

Nach der Umschreibung erhielt man cDNA die für weitere Untersuchungen mittels PCR verwendet wurde.

### 3.2.14.2. Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription (RT-PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist seit ihrer Entwicklung zu einer der wichtigsten Techniken der modernen Molekularmedizin geworden (Mullis and Faloona 1987). Sie ist eine *in vitro* Technik zur gezielten Vermehrung eines DNA-Genomfragments, das zwischen zwei Regionen mit bekannter Nukleotidsequenz liegt. Diese Technik ermöglicht die Amplifikation von geringsten Mengen an Nukleinsäuren von verschiedenen Geweben und Zellen. Jede PCR wurde nach einem gleichen Prinzip durchgeführt: Man benötigte zunächst ein Template (DNA oder cDNA). Durch eine sehr hohe Temperatur erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) des zu untersuchenden Zellmaterials, damit sich anschließend am 5' und 3' Ende des zu amplifizierenden Bereichs die spezifischen Primer (Oligonukleotide) anlagern konnten. Dieser Vorgang, das so genannte „Annealing“, war nötig, damit sich die nun einzelsträngige DNA mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) in Anwesenheit von freien Desoxynukleotid-Triphosphaten wiederherstellen konnten („Elongation“). Ein PCR-Verlauf bestand also immer aus diesen oben genannten drei Schritten. Zu Beginn erfolgte die Denaturierung für meist 2-4 min. bei einer Temperatur von ca. 94°C. Abhängig von den zu untersuchenden Zell (Template) wurde die Temperatur auf die jeweilige Annealingtemperatur gesenkt, um eine Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA zu ermöglichen. Anschließend erfolgte eine Temperaturerhöhung auf 72°C, das Temperaturoptimum für die hitzestabile Taq-Polymerase und für den Prozess der Elongation. Das Enzym stammt aus dem thermophilen Bakterium „*Thermophilus aquaticus*“ und kann kurzfristig bis auf eine Temperatur von 96°C erhitzt werden ohne einen Aktivitätsverlust zu erleiden. Die Komplementierung der DNA lief an beiden Strängen der vorherigen dsDNA, so dass bereits nach einem Zyklus die Anzahl der dsDNA verdoppelt wurde. Am Ende jeder PCR erfolgte eine finale Elongation für 7-10 min.

### 3.2.14.3. Durchführung der semiquantitativen RT-PCR

Jede der folgenden Zellgruppen: BM-SP-, Hoden-SP-Zellen und die Zellgruppen 1 bis 5, wie in Abbildung 7 dargestellt, wurden hinsichtlich der Genexpression von ABCG2, c-Kit, Catsper1, CREM- $\tau$  und  $\beta$ -actin untersucht. Für die Quantifizierung wurden Reaktionsansätze von 25 $\mu$ l Volumen in ein Eppendorf-Cup pipettiert, welches folgende Bestandteile anteilig enthielt:

1.	PCR-Puffer 10x Konz.	2,5 µl
2.	Mg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> 50 mM	2,5 µl
3.	0.625 U Taq- Polymerase	2,5 µl
4.	10mM dNPTs	1,0 µl
5.	50 pmol- Primer 3´	1,0 µl
6.	50 pmol- Primer 5´	1,0 µl
7.	cDNA	1,0 µl
8.	mit H <sub>2</sub> O auf 25µl auffüllen	

Die Durchführung der PCR für oben genannte Primer erfolgte in dem ThermoCycler (PTC 100/200) unter folgenden Bedingungen:

1.	4 min.	96°C initiale Denaturierung
2.	30 s	94°C Denaturierung
3.	30 s	59°C Annealing
4.	45 s	72°C Elongation
5.	25 x ad 2 Zyklen	
6.	5 min.	72°C finale Elongation
7.	10- ∞ min.	10°C Finish

Nachdem die PCR im Thermocycler abgeschlossen war, wurde jede Probe mit 6 µl Loading Buffer versehen und anschließend in die Taschen des Agarosegels 1,5% gefüllt. Der Loading Buffer enthielt Glycerol, was bei Zugabe die Dichte der Probe erhöht und somit das abdiffundieren der Probe aus der gefüllten Gelkammer verhinderte. Außerdem enthielt der Loading Buffer einen Farbstoff, Bromophenol blau, was die Probe sichtbar machte und somit das Befüllen der Gelkammern erleichterte und bereits befüllte Gelkammern kenntlich machte. Das Gel befand sich in einer Gelkammer, die die Amplifikationsprodukte elektrophoretisch auftrennt. Die Quantifizierung der Gele aller genutzten Gene wurde nach fotografischer Digitalisierung mit Hilfe des Computerprogramms GelScan 3D V2.5 durch Messung der optischen Dichte der durch Ethidiumbromid fluoreszierenden Banden durchgeführt und ausgewertet.



### 3.2.15. Übersicht zur angewandten Methodik und Versuchsablauf

Ausgangspunkt der Untersuchungen waren die Einzelzellsuspensionen von Knochenmark und Hoden. Diese wurden in einem ersten allgemeinen Schritt mit dem Vitalfarbstoff Hoechst 33342 inkubiert. Wie in der Einleitung beschrieben kann ein Teil der Hodenzellen aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften Hoechst 33342 binden, also anhand des Ploidiegrades in der FACS-Analyse getrennt werden. Die Zellen in der SP zum Beispiel, die ABCG2 stark exprimieren, werden im Hoechstprofil abgegrenzt. Diese Abgrenzung entsteht durch gerichteten Auswärtstransports von Hoechst 33342 aus den SP Zellen. So ist es möglich, verschiedene Hodenzellgruppen im Hoechstprofil voneinander zu separieren.

Die Anreicherung von Zellen spezifischer Antigenexpression mittels MACS ermöglicht einzelne Gruppen, die im Hoechstprofil erscheinen, vor der Untersuchung vor zu selektieren. In dieser Arbeit wurde die MACS-Vorsortierung anhand der ausgewählten Antigene  $\alpha$ -6-integrin, c-Kit und Thy-1 durchgeführt. Zur Überprüfung, ob eine MACS Vorbehandlung für folgende Zelluntersuchungen sinnvoll ist, wurden die Hoechstprofile des Hodens ohne Vorbehandlung mit MACS und nach Vorbehandlung mit MACS verglichen. Bei erfolgreicher Anreicherung bestimmter Zellgruppen wurde das Verfahren genutzt, um Zellen für das Sortieren in einer Probe anzureichern. Der detaillierte methodische Ablauf einer MACS-Vorbehandlung wurde bereits beschrieben (Kapitel 3.2.9.1).

Für das Sortieren distinkter Hodenzellpopulationen wurden im Hoechstprofil des Hodens sechs separate Zellgruppen markiert, die anhand der Hoechstfluoreszenz in folgende Gruppen unterteilt wurden: Hoden-SP-Zellen und Zellen der Gruppen 1 bis 5, wie in Abbildung 7 dargestellt.

Anschließend wurden die Zellen aus den oben benannten Gruppen bezüglich ihrer Zelloberflächenantigene untersucht. Die Markierung von Zelloberflächenantigenen erfolgte durch die Verwendung spezieller Antikörper: anti-Thy-1, anti- $\alpha$ -6-integrin und anti-c-Kit. An die Antikörper war ein Fluorchrom gekoppelt, das mittels FACS-Analyse detektiert werden konnte. Bei der FACS-Analyse gemessene Parameter, wie Größe, Granularität, DNA-Gehalt und Antigenexpression, von stark bis schwach und nicht detektierbar, wurden genutzt, um die Zellen der sechs Gruppen zu unterscheiden, so dass testikuläre Stammzellen, Spermatogonien A und B, Spermatozyten I und II Ordnung sowie Spermatozoen isoliert und sortiert werden konnten.

Die sortierten Zellgruppen wurden weiter in einer semiquantitativen Untersuchung mittels RT-PCR auf die Expression der Gene, ABCG2, c-Kit, CatSper1, CREM- $\tau$  und  $\beta$ -actin hin untersucht. Die spezifische Genexpression einer Zellgruppe gab Aufschluss über das Entwicklungsstadium einer Zellgruppe und diente zur Kontrolle der

ausgewählten Sortier-Parameter der nachstehenden sechs Gruppen: Testikuläre Stammzellen, Spermatogonien A und B, Spermatozyten I und II Ordnung sowie Spermatisden

Zur Erarbeitung der einzelnen Punkte der Fragestellung dienen die in Tabelle 5 aufgeführten Methoden:

**Tabelle 5: Übersicht der in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Erarbeitung der Fragestellung**

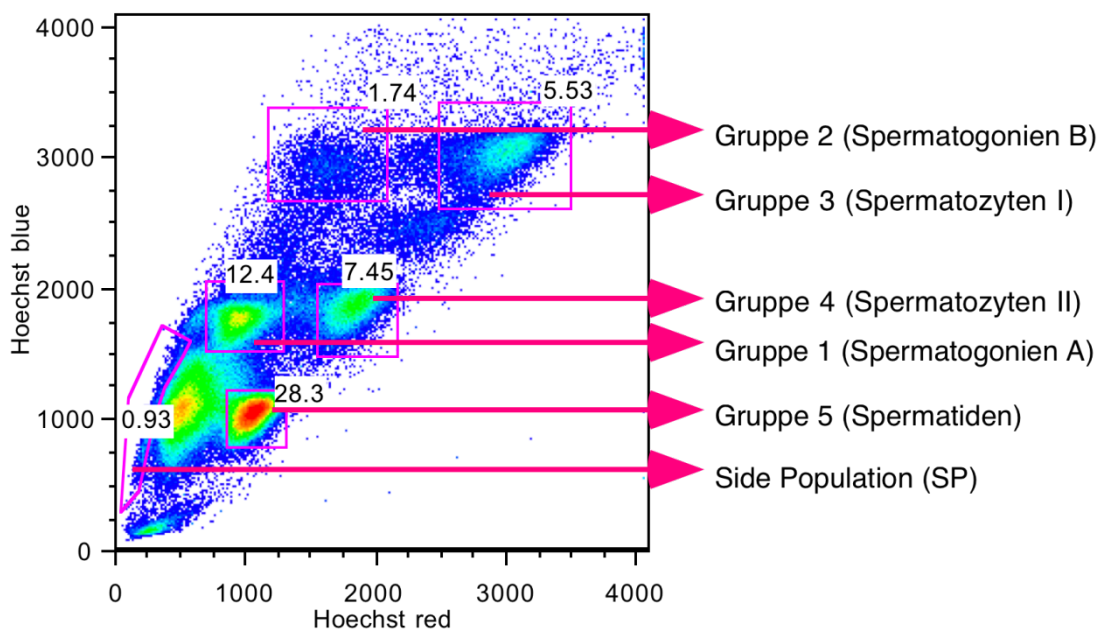
<b>Ziel</b>	<b>Methode</b>
Einteilung und Anreicherung der Hodenzellgruppen von testikulären Stammzellen, Spermatogonien A und B, Spermatozyten I und II Ordnung sowie Spermatisden im Hoechstprofil	<b>Inkubation der Hodenzellen mit Hoechst 33342, Zellanreicherung anhand der Antigene Thy-1, c-Kit und <math>\alpha</math>-6-integrin mittels MACS und Untersuchung mittels FACS</b>
Sortieren distinkter Hodenzellgruppen von testikulären Stammzellen, Spermatogonien A und B, Spermatozyten I und II Ordnung sowie Spermatisden für weitere Untersuchungen	<b>Hoechstfärbung und Antigenmarkierung mit Anti-Thy-1, Anti-c-Kit und Anti-<math>\alpha</math>-6-integrin Antikörpern zur Separation von Zellgruppen mittels FACS-Sort</b>
Überprüfung der sortierten Hodenzellen zur Bestätigung distinkter und suffizienter Sortierkriterien	<b>Untersuchung sortierter Zellgruppen mittels semiquantitativer RT-PCR</b>

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Hodenzellpopulationen

Das Ziel dieser Arbeit war es ein FACS-Protokoll für die sechs Hodenzellpopulationen, testikuläre Stammzellen, Spermatogonien A, Spermatogonien B, Spermatozyten I, Spermatozyten II, sowie Spermatisden, zu erstellen, mit dem es möglich ist, vorhersagbar reine Zellgruppen zu sortieren.

Der Vitalfarbstoff Hoechst 33342 bildete eine Unterscheidungsgrundlage der Hodenzellen in der FACS-Darstellung. Aufgrund unterschiedlichem Ploidiegrades und unterschiedlich starker DNA-Faltung stellten sich die oben genannten Hodenzellgruppen in der FACS-Analyse mit unterschiedlicher blauer und roter Fluoreszenz dar. Dieses organspezifische Fluoreszenzmuster nach Hoechstfärbung wurde hier in der FACS-Analyse als Hoechstprofil bezeichnet.



**Abbildung 7: Hodenzellen im Hoechstprofil.** Darstellung der Hodenzellen nach Hoechstfärbung entsprechend der gemessenen Fluoreszenzintensität von Hoechst blue und Hoechst red. Zellen ähnlicher Fluoreszenz sind durch Gates als Gruppen 1-5 bzw. als Side Population (SP) markiert.

Bei der Untersuchung der Hodenzellen im Hoechstprofil wurden insgesamt sechs Bereiche registriert, in denen sich Zellen ähnlicher Fluoreszenz als Zellgruppen darstellten. Abbildung 7 zeigt die Zuordnung von sechs gegeneinander abgegrenzten Zellgruppen im Hoechstprofil des Hodens. Die SP stellte sich durch einen niedrigen Hoechstgehalt mit niedriger blauer und roter Fluoreszenz dar. Im Zentrum des Dotplot-Zytogramms befanden sich die Zellgruppen 1 und 4 mit einem Ploidiegrad von  $2n$ , wobei die Gruppe 4 eine intensivere Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich

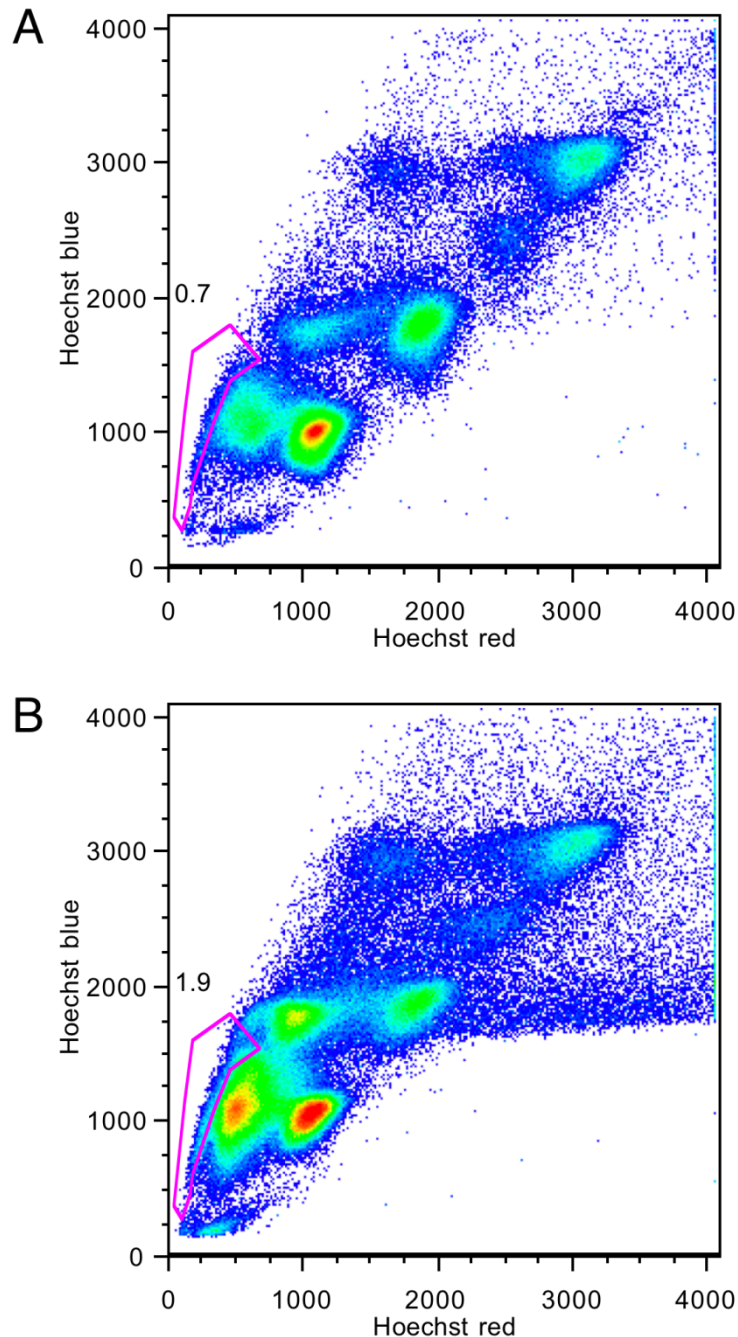
aufwies und somit nach rechts versetzt erschien. Mit in etwa doppelt so intensiver Fluoreszenz im Hoechstprofil stellten sich die Zellgruppen 2 und 3 dar, was auf eine Ploidiegrad von  $4n$  hinwies. Die Gruppe 3 wies eine intensivere Fluoreszenz im roten Wellenlängenbereich auf als Gruppe 2 und war daher nach rechts versetzt. Die Zellgruppe 5 hatte eine Ploidiegrad von  $1n$ , was sich mit etwa halb so intensiver Fluoreszenz im Hoechstprofil wie bei den Zellgruppen 1 und 4 darstellte.

#### **4.2. Zellanreicherung**

Nachdem die Zellen wie oben beschrieben in sechs Gruppen im Hoechstprofil eingeteilt wurden, erfolgte die Untersuchung für eine Anreicherung von Zellen anhand der Antikörper Thy-1, c-Kit und  $\alpha$ -6-integrin mittels MACS. Die Anreicherung von Zellen diente dazu, Zellen, die nur in kleiner Anzahl in einer Zellsuspension vorhanden sind, in einer Zellprobe anzureichern. Durch diese Anreicherung konnten im FACS-Sort Zellen, die ein bestimmtes Oberflächenantigen besitzen, zielgerichtet und effektiv sortiert werden.

Die Gegenüberstellung der Hoechstprofile von Hodenzellsuspensionen mit und ohne MACS-Anreicherung zeigte, dass der prozentuale Anteil einzelner Gruppen durch die Vorbehandlung zunahm. Identisch platzierte Gates stellten sicher, dass dieselben Bereiche im Hoechstprofil verglichen wurden.

#### 4.2.1. Thy-1 Zellanreicherung mittels MACS

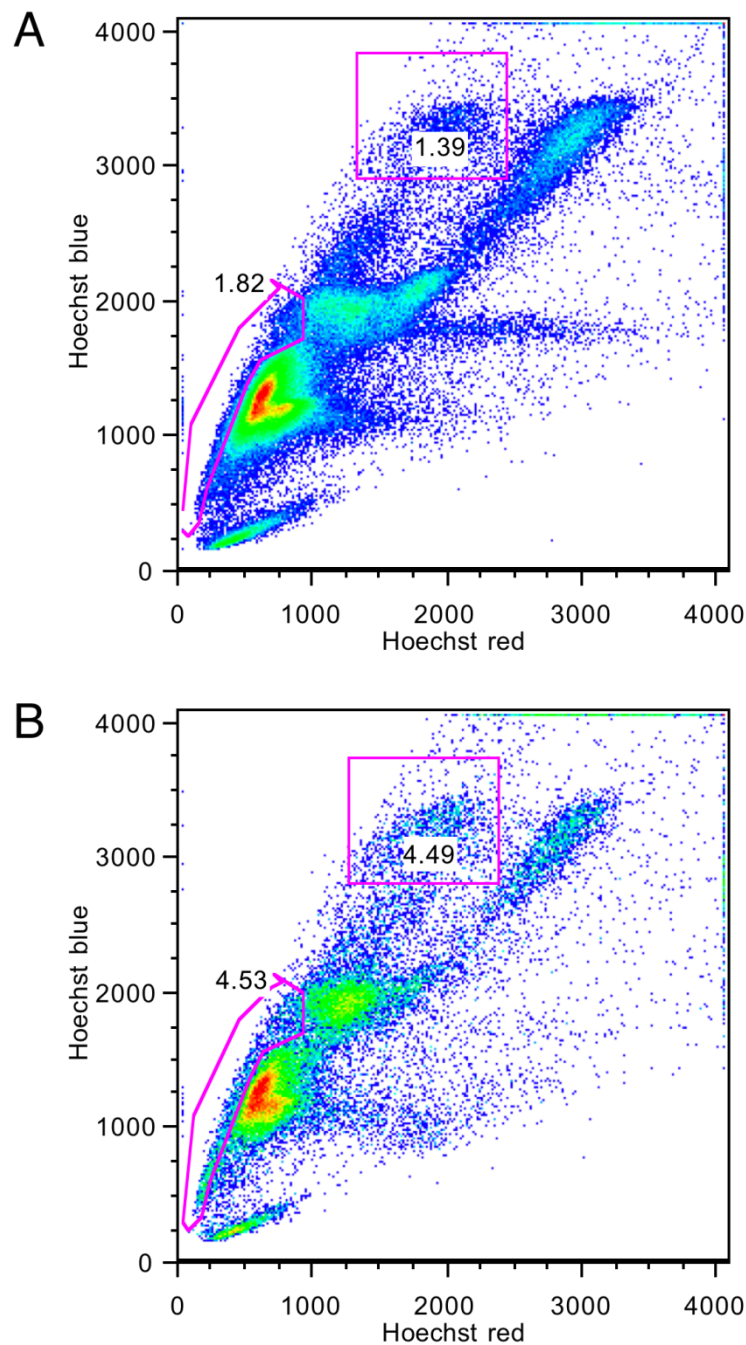


**Abbildung 8: MACS-Anreicherung mit Thy-1-beats:** Darstellung der Hoechst 33342-Fluoreszenz mittels FACS. In den Abb. A und B sind die Zellgruppen des Hodens unterschiedlichem DNA-Gehalts entsprechend ihrer roten und blauen Fluoreszenz dargestellt. Das identisch platzierte Gate in Abb. A und B markiert die Zellgruppe, für die eine Anreicherung mittels MACS für das Antigen Thy-1 möglich ist. **A:** Hodenzellen im Hoechstprofil ohne Zellanreicherung mittels MACS für das Antigen Thy-1 **B:** Hodenzellen im Hoechstprofil nach Zellanreicherung mittels MACS für das Antigen Thy-1 (n=5).

In Abbildung 8 sind die Hodenzellen als Beispiel einer FACS-Analyse nach Zellanreicherung mittels MACS-Thy-1-beats im Hoechstprofil dargestellt. Durch die oben beschriebene Gegenüberstellung einer nicht vorbehandelten Hodenzellsuspension (Abbildung 8A) und einer mit MACS-Thy-1 vorsortierten Zellsuspension (Abbildung 8B) bildet sich der Bereich ab, in dem Zellen registriert

wurden die das Antigen Thy-1 exprimieren. In Abbildung 8A enthielt der mit einem Gate markierte Bereich der SP-Region 0,7% der Gesamtzellen der untersuchten Zellprobe. In Abbildung 8B enthielt der markierte Bereich der SP-Region 1,9% ( $2,2 \pm 0,81$ ) der Gesamtzellen. Die Zellen der SP-Population ließen sich durch die MACS-Thy-1-Anreicherung um einen durchschnittlichen Faktor von 3,14 in einer Zellsuspension anreichern. Bei den FACS-Sort Untersuchungen erfolgte vor dem Sortieren der SP-Hodenzellen die Anreicherung mittels Thy-1 Antikörpern.

#### 4.2.2. $\alpha$ -6-integrin Zellanreicherung mittels MACS



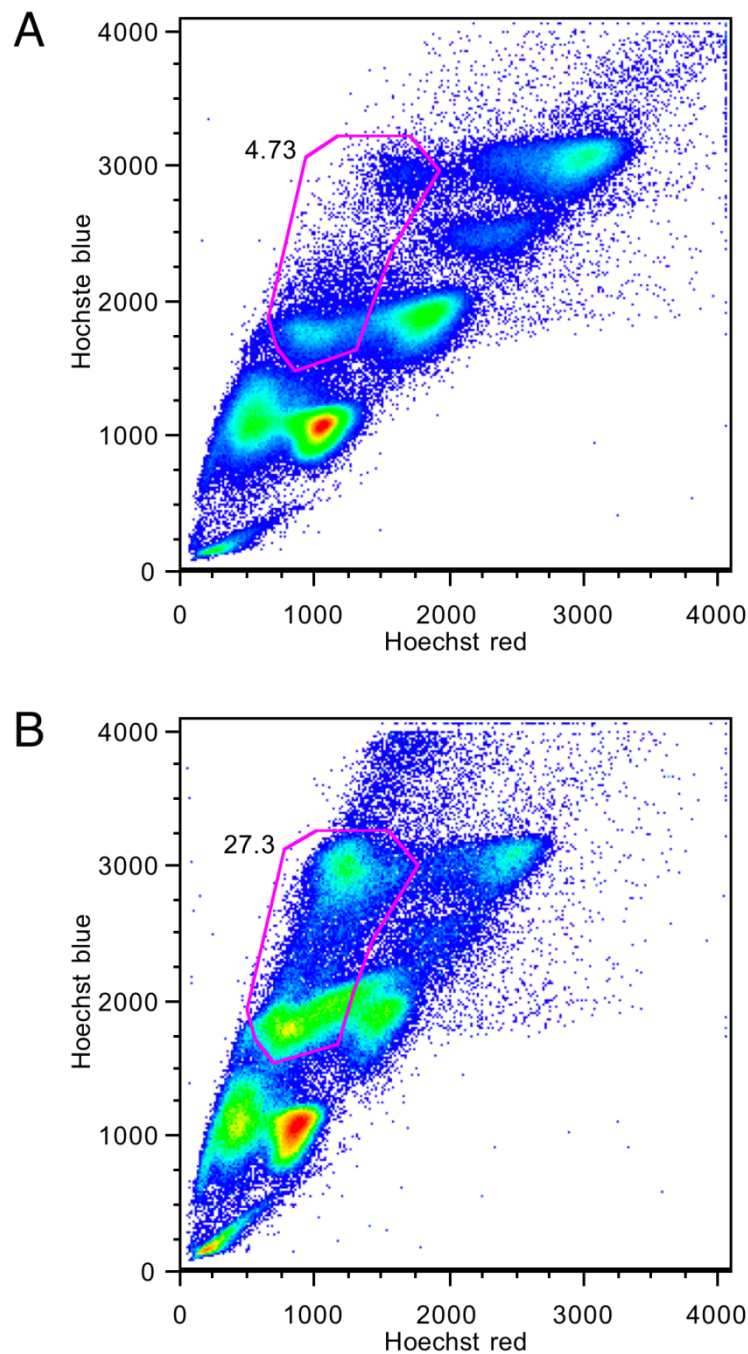
**Abbildung 9: MACS-Anreicherung mit  $\alpha$ -6-integrin-beads:** Darstellung der Hoechst 33342-Fluoreszenz mittels FACS. In den Abb. A und B sind die Zellgruppen des Hodens unterschiedlichem DNA-Gehalts entsprechend ihrer roten und blauen Fluoreszenz dargestellt. Die identisch platzierten Gates in Abb. A und B markieren die Zellgruppen, für die eine Anreicherung mittels MACS für das Antigen  $\alpha$ -6-integrin möglich ist. **A:** Hodenzellen im Hoechstprofil ohne Zellanreicherung mittels MACS für das Antigen  $\alpha$ -6-integrin. **B:** Hodenzellen im Hoechstprofil nach Zellanreicherung mittels MACS für das Antigen  $\alpha$ -6-integrin (n=5).

Als Beispiel für eine Voranreicherung mit MACS- $\alpha$ -6-integrin-beads sind in Abbildung 9 die Hodenzellsuspensionen wie zuvor beschrieben gegenübergestellt. Abbildung 9A zeigt Hodenzellen ohne Vorbehandlung. Die markierten Bereiche in Abbildung 9B enthielten Hodenzellen, in denen die Expression des Antigen  $\alpha$ -6-integrin bei der

MACS-Vorbehandlung registriert werden konnte. In Abbildung 9A enthielt das Gate der SP Zellen 1,82% der Gesamtzellen und das Gate, welches die Gruppe der Spermatogonien B markiert, 1,39% der Gesamtzellmenge. Die identisch platzierten Gates in der Abbildung 9B enthielten bei den SP-Zellen 4,53% ( $3,68 \pm 1,54$ ) der Gesamtzellen der untersuchten Probe und das Gate der Spermatogonien B 4,49% ( $5,73 \pm 1,53$ ) der Gesamtzellen. Die Gegenüberstellung der vorsortierten und nicht vorsortierten Proben zeigte, dass Zellen, die das Antigen  $\alpha$ -6-integrin exprimieren, nach MACS-Vorbehandlung in der SP-Region durchschnittlich um den Faktor 2,0 und in der Region der Spermatogonien B durchschnittlich um den Faktor 4,1 angereichert werden konnten. Die Vorbehandlung mittels  $\alpha$ -6-integrin-Antikörpern führte zu einer Anreicherung der SP-Hodenzellen und Zellen der Gruppe der Spermatogonien B.



### 4.2.3. c-Kit Zellanreicherung mittels MACS



**Abbildung 10: MACS-Anreicherung mit c-Kit-beats:** Darstellung der Hoechst 33342-Fluoreszenz mittels FACS. In den Abb. A und B sind die Zellgruppen des Hodens unterschiedlicher Ploidietät entsprechend ihrer roten und blauen Fluoreszenz dargestellt. Das identisch platzierte Gate in Abb. A und B markiert die Zellgruppe, für die eine Anreicherung mittels MACS für das Antigen c-Kit möglich ist. **A:** Hodenzellen im Hoechstprofil ohne Zellanreicherung mittels MACS für das Antigen c-Kit. **B:** Hodenzellen im Hoechstprofil nach Zellanreicherung mittels MACS für das Antigen c-Kit (n=5).

Abbildung 10 zeigt beispielhaft die Gegenüberstellung der Hoechstprofile einer Hodenzellsuspension, die mit MACS-c-Kit-beats vorbehandelten wurde (Abbildung 10B) und einer nicht vorbehandelten Hodenzellsuspension (Abbildung 10A). In der Abbildung 10A enthielten die mit einem Gate markierten Gruppen der Spermatogonien A und B 4,73% der Gesamtzellen. In der Abbildung 10B enthielt der identisch markierte Bereich

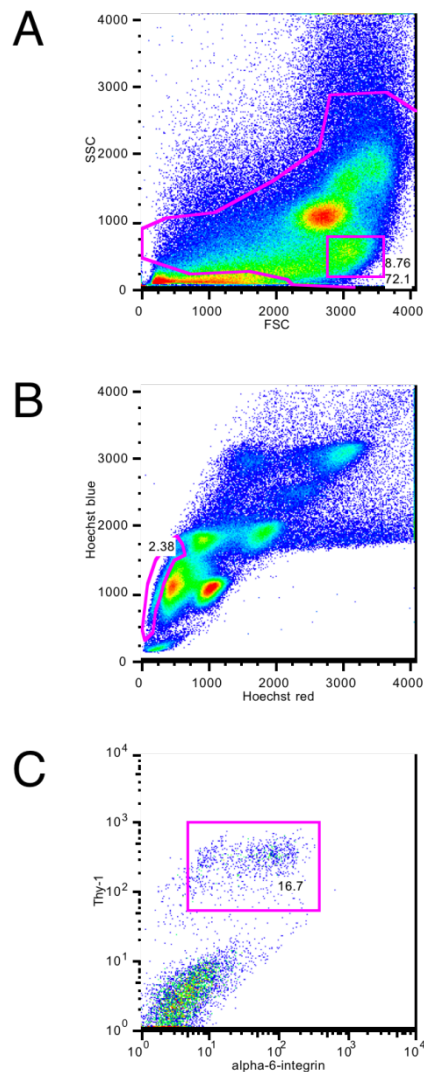
27,3% ( $15,66 \pm 2,43$ ) der Gesamtzellen der untersuchten Probe. Die Gegenüberstellung zeigt, dass Zellen die das Oberflächenantigen c-Kit exprimieren und mit MACS vorbehandelt wurden für die Gruppen der Spermatogonien A und der Spermatogonien B durchschnittlich um den Faktor von 3,31 angereichert werden konnten. Die Voranreicherung von Spermatogonien A mittels c-Kit-beads wurde vor dem Sortieren der Spermatogonien A mittels FACS-Sort durchgeführt.

### **4.3. Fraktionierungsprotokoll für Hodenzellpopulationen**

Für das Sortieren distinkter Hodenzellpopulationen wurden die im Hoechstprofil des Hodens markierten Zellgruppen weiter untersucht. Nach der Gruppeneinteilung, die anhand der Hoechstfluoreszenz in Abbildung 7 vorgenommen wurde, erfolgte die weitere Charakterisierung der sechs Zellgruppen durch die Markierung von Zelloberflächenantigenen mittels Fluorchromen, die an die spezifischen Antikörper Thy-1,  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelt waren.

Die Erkenntnisse aus der Zellanreicherung mittels MACS wurden genutzt, um Hodenzellen vor dem Sortieren innerhalb einer Population anzureichern. Wie oben beschrieben wurden Zellen der SP (Abbildung 7) mittels Thy-1-Zellanreicherung vorsortiert. Das Vorsortieren der Hodenzellen mittels  $\alpha$ -6-integrin-Zellanreicherung wurde durchgeführt, um Zellen der SP und der Zellgruppe 2 (Abbildung 7) anzureichern. Die Voranreicherung mittels c-Kit wurde für die Zellen der Gruppe 1 (Abbildung 7) durchgeführt.

### 4.3.1. FACS-Sortierparameter für testikuläre SP-Zellen

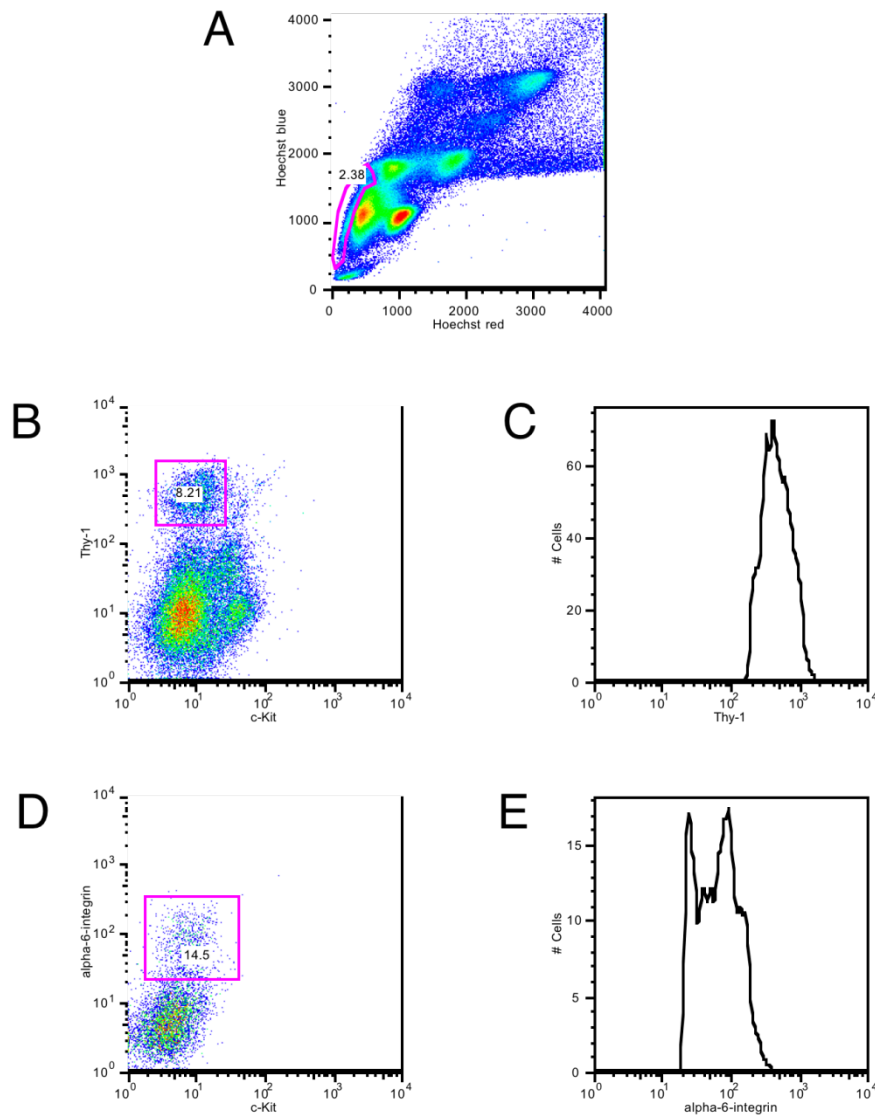


**Abbildung 11: Sortierkriterien für testikuläre SP-Zellen:** Die Abb. A bis C zeigen die Auswahlparameter für den FACS-Sort von testikulären SP-Zellen. **A:** Darstellung der Hodenzellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC). Das Gate markiert kleine Zellen, für die eine geringe Granularität detektiert wird. **B:** Darstellung der Hoechst 33342-Fluoreszenz für Hodenzellen. Das Gate markiert SP-Zellen, die sich durch geringe rote und blaue Hoechst 33342-Fluoreszenz darstellen. **C:** Darstellung der Zellen aus dem Gate der Abb. B entsprechend der Antigenexpression von Thy-1 und  $\alpha$ -6-integrin. Das Gate markiert Zellen, die Thy-1 und  $\alpha$ -6-integrin exprimieren ( $n=13$ ).

Am Beispiel der in den Abbildung 11 und Abbildung 12 dargestellten Parameter wurden die testikulären SP-Zellen sortiert. Eine Zelle mit den in Abbildung 11A-C gezeigten Eigenschaften: kompakte Zellgröße, geringe Granularität, Lokalisation in der SP-Region und hohe Fluoreszenzintensität für die Fluorochrome, die an Thy-1- und  $\alpha$ -6-integrin-Antikörper gekoppelt sind, wurde vom FACS-Sorter in ein separates Eppendorf Cup sortiert. Die so gewonnenen Zellen wurden im weiteren Verlauf mittels semiquantitativer PCR untersucht um die Genexpression dieser Zellpopulation zu bestimmen.

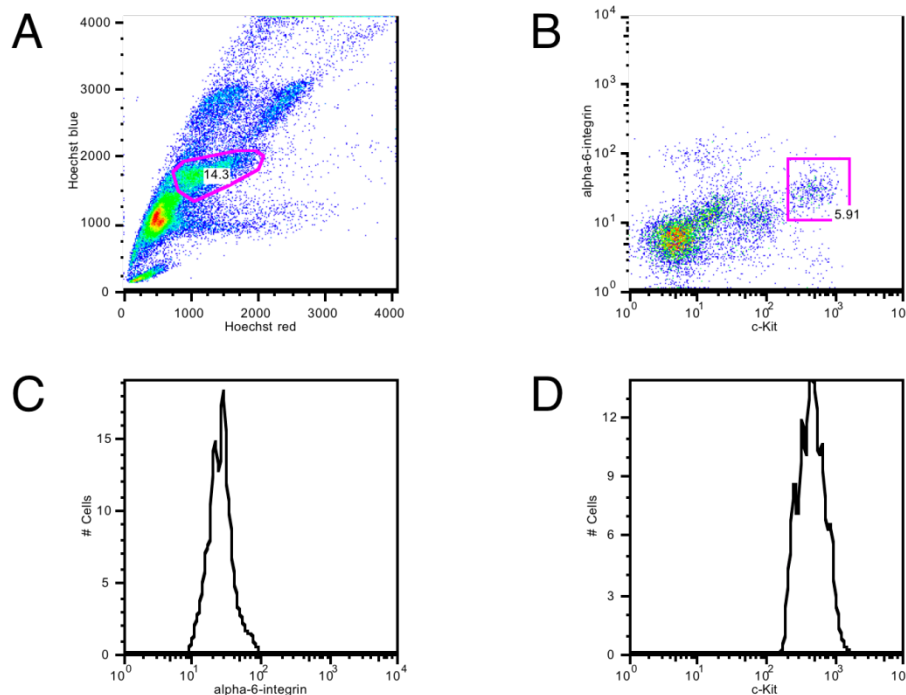
Abbildung 11A zeigt die Zellsortierung nach Zellgranularität und Zellgröße mit der Darstellung SSC gegen FSC. Das Gate in Abbildung 11A markierte stammzellähnliche

Zellen, die eine für Stammzellen typische Zellgröße und Granularität aufwiesen. Zellen, die mit dem Gate markiert wurden, sind SSC low und FSC high (SSC<sup>lo</sup> und FSC<sup>hi</sup>). Die Abbildung 11B zeigt die Hoechst 33342-Fluoreszenz der Hodenzellen. Durch eine Voranreicherung mittels MACS-Thy-1 wurde wie oben beschrieben zunächst der Anteil der SP-Zellen in der Probe gesteigert. Das Gate markiert die SP-Zellen. Die im Gate der SP-Region liegenden Zellen sind in der Abbildung 11C in der Gegenüberstellung der Antigene Thy-1 zu  $\alpha$ -6-integrin abgebildet. Das Gate in der Abbildung 11C markiert die Zellen, auf deren Oberfläche eine hohe Fluoreszenzintensität für beide an Fluorochrome gekoppelte Antigene nachweisbar war. Diese Eigenschaften der Zellen wurden als Thy-1 stark positiv und  $\alpha$ -6-integrin positiv definiert (Thy-1<sup>hi</sup> und  $\alpha$ -6-integrin<sup>+</sup>). Nachfolgend sind die Zellen der SP-Region in der Gegenüberstellung entsprechend der gemessenen Fluoreszenzintensität dargestellt. Die an Fluorochrome gekoppelten Antikörper Thy-1 beziehungsweise  $\alpha$ -6-integrin wurden gegenüber c-Kit abgebildet. Abbildung 12A zeigt dasselbe Hoechstprofil des Hodens wie Abbildung 11B. Die Abbildung 12B stellt die Fluoreszenzintensitäten für die Antigene Thy-1 und c-Kit der Zellen aus der SP-Region gegenüber. Zellen, die mit einem Gate in Abbildung 12B markiert sind, wiesen eine hohe Fluoreszenzintensitäten für das Antigen Thy-1 auf. Diese Zellen wiesen in Abbildung 12C hinsichtlich ihrer Fluoreszenz eine hohe Intensität für das Antigen Thy-1 (Thy-1<sup>hi</sup>) auf. Abbildung 12D stellt die Fluoreszenzintensitäten der Antigene  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit der Zellen aus der SP-Region gegenüber. In Abbildung 12D wurden die Zellen mit einem Gate markiert, für die eine Fluoreszenzintensität für das Antigen  $\alpha$ -6-integrin registriert werden konnte. Die Zellen aus dem Gate der Abbildung 12D ließen eine Fluoreszenzintensität für das Antigen  $\alpha$ -6-integrin ( $\alpha$ -6-integrin<sup>+</sup>) erkennen. Es konnte keine Fluoreszenz für das Antigen c-Kit auf SP-Zellen detektiert werden (c-Kit<sup>-</sup>) (Abbildung 12B und D).



**Abbildung 12: Fluoreszenz der Hoden-SP-Zellen:** Die für Hoden-SP-Zellen detektierte Fluoreszenzintensität der an  $\alpha$ -6-integrin, c-Kit und Thy-1 gekoppelten Fluorochrome, wird in den Abb. B und D dargestellt. Abb. C und E zeigen im Histogramm die gemessene Signalintensität. **A:** Darstellung der Hoechst 33342-Fluoreszenz für Hodenzellen. Das Gate markiert SP-Zellen **B:** Darstellung der SP-Zellen entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität der an Thy-1 und c-Kit gekoppelten Fluorochrome. Das Gate markiert Zellen, die Thy-1 stark und c-Kit nicht exprimieren. **C:** Darstellung der gemessenen Signalintensität für Thy-1. **D:** Darstellung der SP-Zellen entsprechend ihrer Fluoreszenzintensität der an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorochrome. Das Gate markiert Zellen, die  $\alpha$ -6-integrin stark und c-Kit nicht exprimieren. **E:** Darstellung der gemessenen Signalintensität für  $\alpha$ -6-integrin (n=13).

### 4.3.2. FACS-Sortierparameter von Zellen der Gruppe 1 (Spermatogonien A)



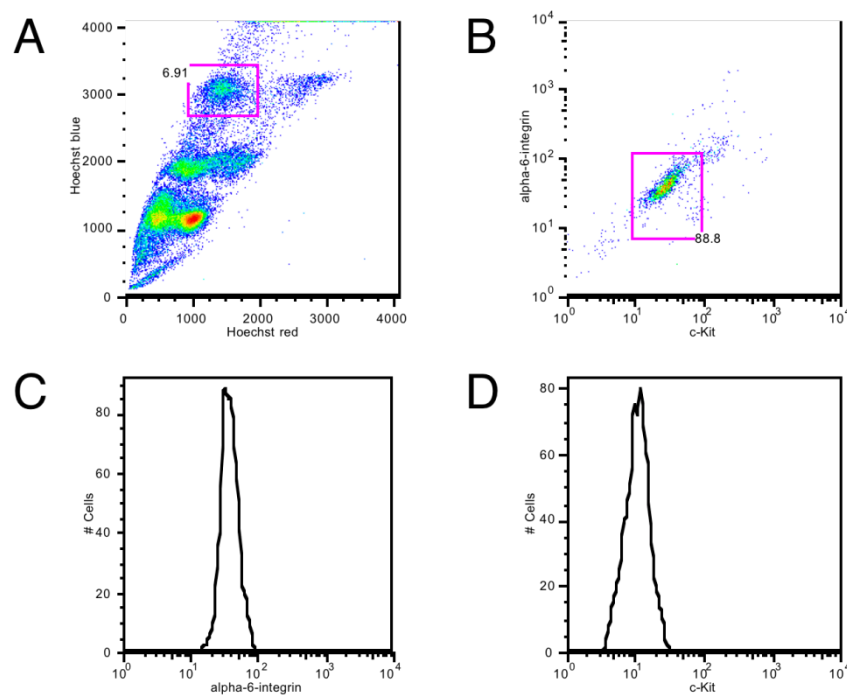
**Abbildung 13. FACS-Sort der Gruppe 1 (Spermatogonien A):** Die Abb. A und B zeigen die Auswahlkriterien beim Sortieren der Zellen von Gruppe 1 mittels FACS. Abb. C und D stellen im Histogramm die gemessenen Signalintensität der an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorochrome dar. **A:** Darstellung der Hoechst 33342-Fluoreszenz für Hodenzellen. Das Gate markiert Zellen der Gruppe 1. **B:** Darstellung der Fluoreszenzintensität gemäß der an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorochrome. Das Gate in Abb. B markiert Zellen für die ein  $\alpha$ -6-integrin- und c-Kit-Signal detektiert wird. **C:** Darstellung der Signalintensität für  $\alpha$ -6-integrin. **D:** Darstellung der Signalintensität für c-Kit (n=13).

Am Beispiel der Abbildung 13 sind die Parameter dargestellt, anhand derer die in der Abbildung 7 mit einem Gate markiert und als Gruppe 1 definierten Zellen (vermutlich Spermatogonien A) des Hoechstprofils sortiert wurden. Alle Zellen, die folgende Eigenschaften aufwiesen, wurden in ein separates Eppendorf Cup sortiert: zentrale Lage im Hoechstprofil (DNA Gehalt=2n) bei normaler roter und blauer Hoechst 33342-Fluoreszenz und positive Fluoreszenzintensität für die Fluorochrome, die an c-Kit- und  $\alpha$ -6-integrin-Antikörper gekoppelt sind. Im späteren Verlauf erfolgte die semiquantitative Analyse, um die Genexpression dieser Zellpopulation zu bestimmen.

Zellen der Gruppe 1 nach Voranreicherung mittels MACS-c-Kit-beads sind in der Abbildung 13A im Hoechstprofil dargestellt. Die zentral liegende Population in Abbildung 13A wurde mit einem Gate markiert und die darin enthaltenen Zellen wurden in Abbildung 13B entsprechend der gemessenen Fluoreszenzintensität für die an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorochrome dargestellt. Das Gate in Abbildung 13B markiert Zellen, für die ein Fluoreszenzsignal für c-Kit und  $\alpha$ -6-integrin gemessen wurde. Die Abbildung 13C und Abbildung 13D zeigen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten für die an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorochrome. Die

Darstellung der gemessenen Fluoreszenzintensität des Antigens  $\alpha$ -6-integrin in Abbildung 13C ließen ein klares Signal erkennen, das als  $\alpha$ -6-integrin positiv ( $\alpha$ -6-integrin<sup>+</sup>) definiert wurde. Die dargestellte Fluoreszenzintensität für das Antigen c-Kit in Abbildung 13D zeigte ein intensives Signal für das an c-Kit gekoppelte Fluorchrom und wurde als c-Kit stark positiv (c-Kit<sup>hi</sup>) beschrieben.

#### 4.3.3. FACS-Sortierparameter von Zellen der Gruppe 2 (Spermatogonien B)

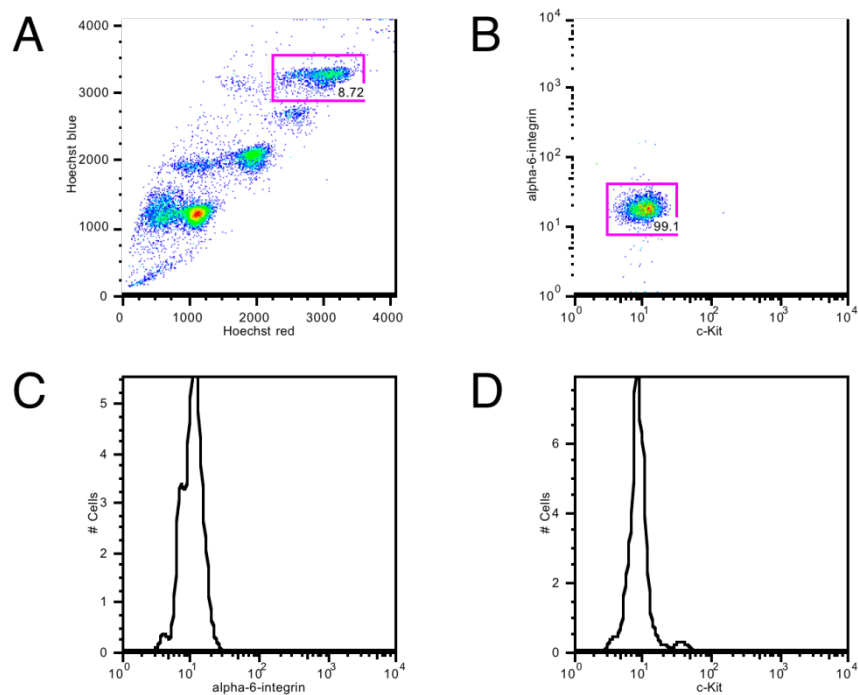


**Abbildung 14: FACS-Sort der Gruppe 2 (Spermatogonien B):** Die Abb. A und B zeigen die Auswahlkriterien beim FACS-Sort der Zellgruppe 2. Abb. C und D stellen die gemessenen Signalintensität der an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorchrome im Histogramm dar. **A:** Darstellung der Hoechst 33342-Fluoreszenz für Hodenzellen der Gruppe 2, die mit dem Gate markiert sind. **B:** Darstellung der Fluoreszenzintensität gemäß der an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorchrome. Das Gate in Abb. B markiert Zellen für die ein  $\alpha$ -6-integrin- und c-Kit-Signal detektiert wird. **C:** Darstellung der Signalintensität für  $\alpha$ -6-integrin. **D:** Darstellung der Signalintensität für c-Kit (n=13).

In der Abbildung 14 sind die Parameter gezeigt, anhand derer die Zellen der Gruppe 2 im FACS-Sort ausgewählt wurden. Die Gruppe 2 des Hoechstprofil des Hodens (Abbildung 7), welche einen DNA Gehalt von 4n hat und vermutlich Spermatogonien B enthält, wurde nach folgenden Kriterien sortiert: normale rote und intensive blaue Hoechst-Fluoreszenz im Hoechstprofil sowie positive Fluoreszenzintensität für die an c-Kit- und  $\alpha$ -6-integrin-Antikörper gekoppelten Fluorchrome. Selektierte Zellen wurden im weiteren Verlauf semiquantitativ hinsichtlich ihrer Genexpression untersucht. Die Abbildung 14A zeigt das Hoechstprofil des Hodens, bei dem eine Voranreicherung mittels MACS-c-Kit-beats durchgeführt wurde. Die mit dem Gate markierten Zellen in Abbildung 14A wurden in Abbildung 14B entsprechend der Fluoreszenzintensität der an

$\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorochrome dargestellt. Die Abbildung 14C und Abbildung 14D stellen die gemessenen Fluoreszenzintensitäten dar. Die detektierten Signalintensitäten, der in Abbildung 14B mit einem Gate markierten Zellen waren für  $\alpha$ -6-integrin klar positiv ( $\alpha$ -6-integrin<sup>+</sup>, Abbildung 14C) und für c-Kit schwach positiv (c-Kit<sup>lo</sup>, Abbildung 14D).

#### 4.3.4. FACS-Sortierparameter von Zellen der Gruppe 3 (Spermatozyten I)



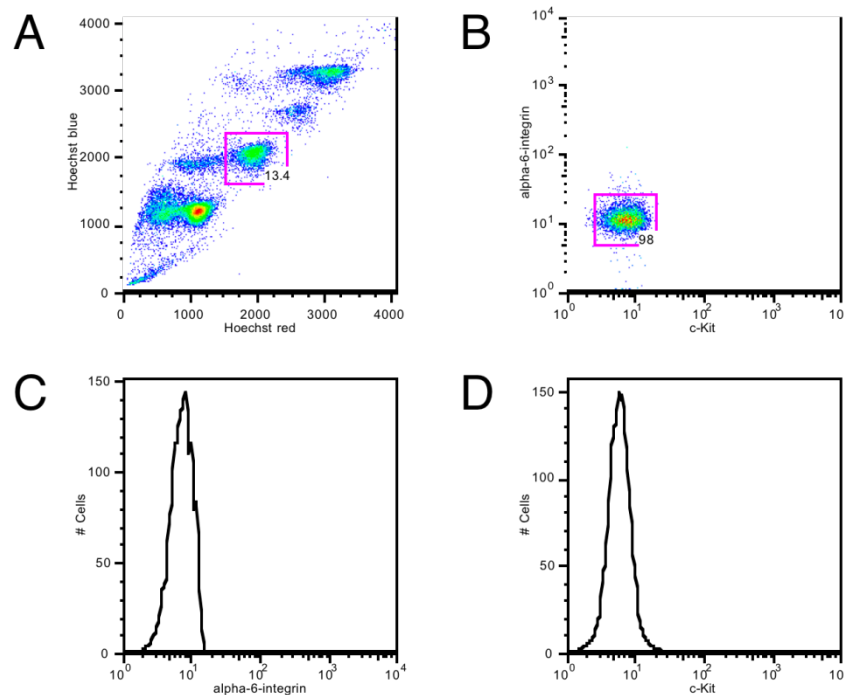
**Abbildung 15: FACS-Sort der Gruppe 3 (Spermatozyten I):** Die Abb. A und B zeigen die Parameter nach denen Zellen Gruppe 3 mittels FACS-Sort selektiert werden. Abb. C und D stellen im Histogramm die gemessenen Signalintensität der an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorochrome dar. **A:** Darstellung der Zellgruppe 3 entsprechend der Hoechst 33342-Fluoreszenz. Das Gate markiert die Zellpopulation mit intensiver roter und blauer Hoechst33342-Fluoreszenz. **B:** Darstellung der Fluoreszenzintensität gemäß der an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorochrome. Das Gate in Abb. B markiert Zellen für die ein  $\alpha$ -6-integrin- und c-Kit-Signal detektiert wird. **C:** Darstellung der Signalintensität für  $\alpha$ -6-integrin. **D:** Darstellung der Signalintensität für c-Kit (n=13).

In Abbildung 15 sind die FACS-Sortierkriterien der in Abbildung 7 als Gruppe 3 definierten Gruppe dargestellt, die sich durch einen DNA Gehalt von 4n auszeichnet und vermutlich Spermatozyten I enthält. Die Sortierkriterien für die Gruppe 3 waren eine intensive rote und intensive blaue Hoechst 33342-Fluoreszenz im Hoechstprofil, sowie schwache bis negative Fluoreszenzintensität für die an c-Kit- und  $\alpha$ -6-integrin-Antikörper gekoppelten Fluorochrome. Die Abbildung 15A zeigt das Hoechstprofil des Hodens in dem die Zellen der Gruppe 3 mit einem Gate markiert sind. Die Zellen aus Abbildung 15A werden in Abbildung 15B entsprechend der Fluoreszenzintensität für  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gegenübergestellt. Die Abbildung 15C und Abbildung 15D zeigen die detektierbare Fluoreszenzintensität, der in Abbildung 15B markierten Zellen. Die



gemessene Signalstärke der Fluoreszenz der an  $\alpha$ -6-integrin- und c-Kit-Antikörper gekoppelten Fluorochrome war sowohl für  $\alpha$ -6-integrin als auch für c-Kit schwach bis negativ ( $\alpha$ -6-integrin<sup>lo/-</sup>, Abbildung 15C, c-Kit<sup>lo/-</sup>, Abbildung 15D).

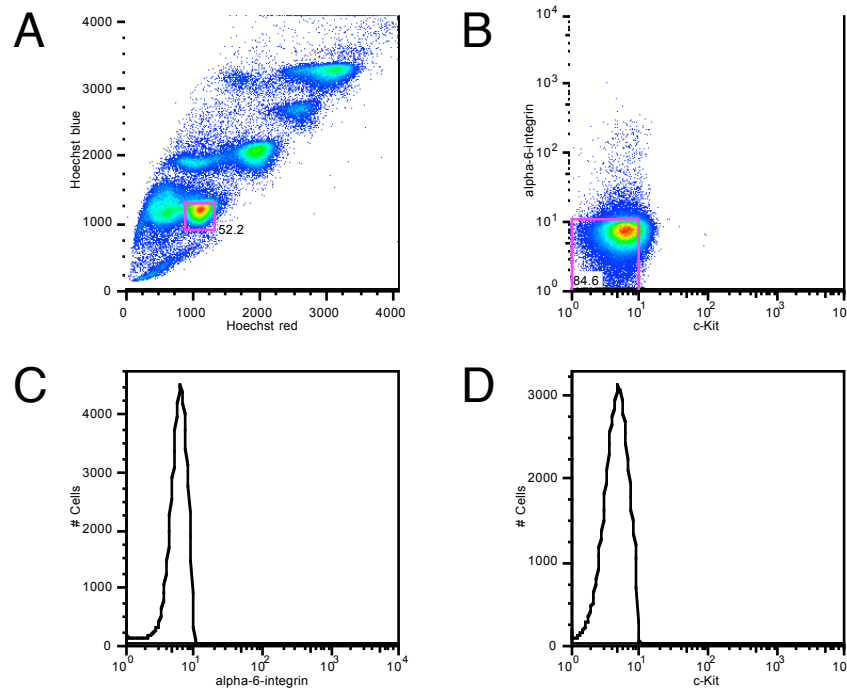
#### 4.3.5. FACS-Sortierparameter von Zellen Gruppe 4 (Spermatozyten II)



**Abbildung 16: FACS-Sort der Gruppe 4 (Spermatozyten II):** Die Abb. A und B stellen die Auswahlkriterien der Hodenzellen Gruppe 4 im FACS-Sort dar. Abb. C und D zeigen die gemessenen Signalintensität der an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorochrome. **A:** Mit dem Gate sind Zellen der Gruppe 4 markiert, die sich im Hoechstprofil mit einer normalen blauen und intensiven roten Fluoreszenz darstellen. **B:** Darstellung der Zellgruppe 4 hinsichtlich der Fluoreszenzintensität der an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorochrome. **C:** Darstellung der Signalintensität der Zellen für das Antigen  $\alpha$ -6-integrin aus Abb. B. **D:** Darstellung der Signalintensität der Zellen für das Antigen c-Kit aus Abb. B (n=13).

Abbildung 16 zeigt die Sortierparameter der Gruppe 4 des Hoechstprofils (Abbildung 7) für die sich anschließende semiquantitative Analyse hinsichtlich der Genexpression. Die Eigenschaften der Zellen aus Gruppe 4 kennzeichnen sich durch eine normale blaue und intensive rote Hoechst 33342-Fluoreszenz im Hoechstprofil (Abbildung 16A) und einen DNA-Gehalt von 2n und sind vermutlich Spermatozyten II. Diese Zellen werden in Abbildung 16B entsprechend der gemessenen Fluoreszenz der an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorochrome dargestellt. Die Abbildung 16C und Abbildung 16D stellen die gemessenen Signalstärken der Fluoreszenz, der in Abbildung 16B markierten Zellen dar. Es sind keine Fluoreszenzintensitäten für die Antigene  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit detektierbar ( $\alpha$ -6-integrin<sup>-</sup>, Abbildung 16C; c-Kit<sup>-</sup>, Abbildung 16D).

#### 4.3.6. FACS-Sortierparameter von Zellen der Gruppe 5 (Spermatiden)



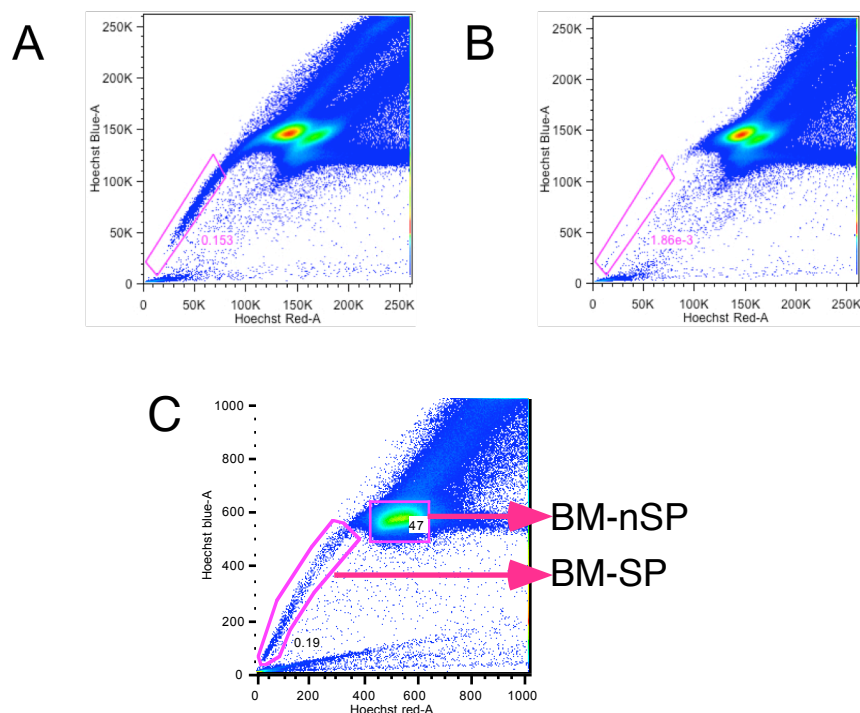
**Abbildung 17: FACS-Sort der Gruppe 5 (Spermatiden):** Die Abb. A und B zeigen die Auswahlkriterien beim Sortieren der Zellen von Gruppe 5 mittels FACS. Abb. C und D zeigen im Histogramm die gemessenen Signalintensität der an  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorchrome. **A:** Darstellung der Hodenzellen entsprechend roter und blauer Hoechst 33342-Fluoreszenz im Hoechstprofil. Zellgruppe 5 ist mit einem Gate markiert. **B:** Darstellung der Fluoreszenzintensität von den  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit gekoppelten Fluorchromen. **C:** Darstellung der Signalintensität der Zellen für das Antigen  $\alpha$ -6-integrin aus Abb.B. **D:** Darstellung der Signalintensität der Zellen für das Antigen c-Kit aus Abb. B (n=13).

In Abbildung 17 sind beispielhaft die Sortierparameter für den FACS-Sort, der zuvor definierten Gruppe 5 (Abbildung 7) dargestellt. Zellen dieser Gruppe kennzeichneten sich durch niedrige blaue und rote Hoechst 33342-Fluoreszenz im Hoechstprofil, einen DNA-Gehalt von  $1n$ , sowie nicht detektierbare Signalintensitäten der Fluorchrome, die an c-Kit- und  $\alpha$ -6-integrin-Antikörper gekoppelt sind. Vermutlich sind Zellen dieser Gruppe Spermatiden.

Auf den in Abbildung 17A markierten Zellen wurden keine Fluoreszenzsignale für die an Fluorchrome gekoppelten Antikörper  $\alpha$ -6-integrin und c-Kit detektiert ( $\alpha$ -6-integrin<sup>-</sup> und c-Kit<sup>-</sup>, Abbildung 17 B-D).

#### 4.4. FACS-Analyse und FACS-Sort der Knochenmarkszellen

Die Knochenmarkszellen wurden vor der Hoechst 33342-Färbung auf zwei Proben aufgeteilt. Die Hoechstfärbung einer Probe des Knochenmarks erfolgte in der Anwesenheit von Verapamil (Verapamil positiv). Die Anwesenheit von Verapamil während der Hoechstfärbung hat zur Folge, dass durch die Hemmung der ABCG2 Transporter durch Verapamil Hoechst 33342 nicht aus der Zelle transportiert werden kann und die SP nicht beziehungsweise nur schwach ausgebildet wird. Die Verapamil positive Probe diente als interne Kontrolle. Die Hoechst 33342-Färbung der anderen Probe erfolgte ohne Zusatz von Verapamil (Verapamil negativ). Bis zum FACS-Sort wurden die Verapamil positiv und die Verapamil negativ Probe bei 4°C aufbewahrt. Die Sortierung der Knochenmarkszellen für die anschließende RT-PCR erfolgte aus der Verapamil-negativen Probe. In dieser Probe waren die ABCG2-Transporter nicht inhibiert, so dass sie Hoechst 33342 aus dem Zelllumen aktiv hinaus transportieren konnten und es zur Ausbildung einer SP im Hoechstprofil des Knochenmarks kam.



**Abbildung 18: FACS-Analyse und Sortierkriterien der Knochenmarkszellen:** Die Abb. A, B und C zeigen das Hoechstprofil des Knochenmarks in der Darstellung Hoechst blue gegenüber Hoechst red. **A:** Darstellung der Knochenmarkszellen mittels FACS nach Inkubation mit Hoechst 33342 ohne Verapamil. Die SP-Region ist mit einem Gate markiert. **B:** Darstellung der Knochenmarkszellen mittels FACS nach Inkubation mit Hoechst 33342 und Verapamil. Die SP-Region ist mit einem Gate markiert. **C:** Darstellung der Knochenmarkszellen mittels FACS nach Inkubation mit Hoechst 33342. Die Gates markieren die Bereiche aus denen Zellen sortiert werden. **BM-nSP**= Knochenmarkszellen nicht aus der SP-Region, **BM-SP**= Knochenmarkszellen aus der SP-Region

Abbildung 18A, B und C zeigen das Hoechstprofil des Knochenmarks in der Darstellung Hoechst blue gegenüber Hoechst red. Die in Abbildung 18A dargestellten Zellgruppen stammen aus der Probe des Knochenmarks, bei der die Hoechstfärbung ohne Verapamil erfolgte. Zellen, die Hoechst gerichtet aus der Zelle heraus transportieren, stellten sich mit niedriger blauer und roter Fluoreszenz als SP dar. Die Zellen, die in diesem Gate enthalten waren, wurden als BM-SP Zellen sortiert, wie in Abbildung 18C dargestellt. Die in der Abbildung 18B dargestellten Zellen stammen aus der Probe des Knochenmarks, bei der die Hoechstfärbung mit Verapamil durchgeführt wurde. Das Gate der SP-Zellen, welches in der Abbildung 18A als SP Gate markiert ist, befindet sich in der Abbildung 18B an der identischen Position. Abbildung 18C zeigt die Gates, anhand derer die Knochenmarkszellen im weiteren Verlauf sortiert wurden. Die durch die Gates markierten Zellen wurden vom FACS-Sorter in Cups sortiert. Die Zellen des Knochenmarks, die kein Hoechst aus der Zelle transportieren können, lagen nicht in der SP-Region und wurden mit dem Gate: BM-nSP markiert. Die Zellen des Knochenmarks, die Hoechst aus der Zelle transportieren können, lagen in der SP-Region und wurden mit dem Gate: BM-SP markiert.

#### 4.5. Kontrolle der sortierten Zellen mittels RT-PCR

Die nach oben festgelegten Kriterien sortierten Zellen wurden anschließend mittels RT-PCR untersucht, um die Zuteilung der sortierten Zellgruppen zu den Hodenzellpopulationen zu überprüfen. Die aus dem Knochenmark sortierten Zellen dienten als interne Kontrolle für das Organ Knochenmark selbst und als Kontrolle für das Zustandekommen der SP im Hoden. Diese Untersuchung mittels RT-PCR diente zur Überprüfung der Genexpression der jeweiligen Zellgruppen. Die Hodenzellen exprimieren Reifestadien-abhängig verschiedene Gene. Die Expression der einzelnen Gene in einer Probe zeigte die Zugehörigkeit der sortierten Hodenzellgruppen zu einem bestimmten Zellentwicklungsstadium.

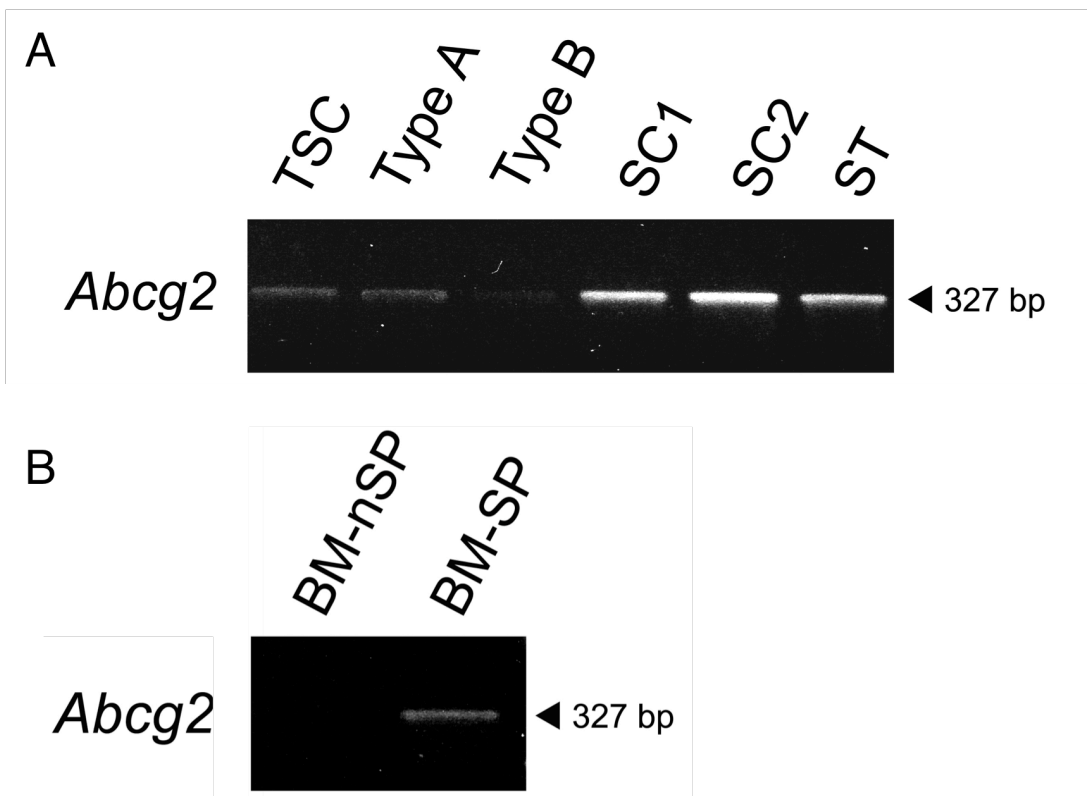
Die folgende Tabelle stellt die in den sortierten Hodenzellgruppen exprimierten Gene dar: ABCG2, c-Kit, CatSper1, CREM- $\tau$  und  $\beta$ -actin. Anhand der Genexpression wurden die zuvor sortierten Hodenzellgruppen den Hodenpopulationen testikuläre Stammzelle, Spermatogonie A und B, Spermatozyte I und II sowie Spermatoide zugeordnet.

**Tabelle 6: Zuordnung der Hodenzellgruppen des Hoechstprofils zu Hodenzellpopulationen der Spermatogenese anhand der Genexpression von ABCG2, c-Kit, CatSper1, CREM- $\tau$  und  $\beta$ -actin. TSC= testikuläre Stammzelle; Type A= Spermatogonie Type A; Type B= Spermatogonie Type B; SC I= Spermatozyte I Ordnung; SC II= Spermatozyte II Ordnung; ST= Spermatoide**

Sortierte Gruppen						
Gen	SP	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
ABCG2	++	+	neg	++	++	+
c-Kit	neg	+++	++	++	+	neg
Catsper 1	neg	neg	neg	++	++	++
CREM- $\tau$	neg	neg	neg	++	++	++
$\beta$ -actin	+	+	+	+	+	+
	TSC	Type A	Type B	SC I	SC II	ST
Zuordnung der Hodenzellen anhand detektierter Genexpression in den sortierten Zellgruppen						

In den folgenden Abbildungen ist die Expression der Gene ABCG2, c-Kit, CatSper1, CREM- $\tau$  und  $\beta$ -actin detailliert für jede Hodenzellpopulation aufgeführt.

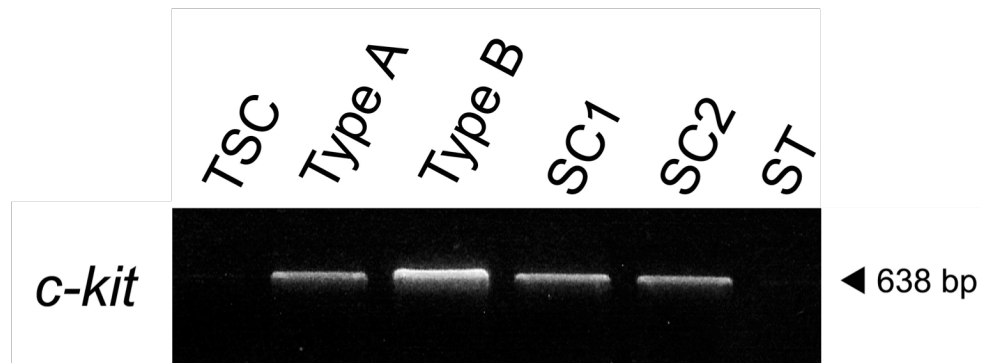
#### 4.5.1. ABCG2-Expression in Hodenzellen und Knochenmark



**Abbildung 19: ABCG2-Expression:** Abb. A und B zeigen die Expression von ABCG2 in unterschiedlichen Zellen, die Banden liegen in einer Höhe von 327 Basenpaaren (bp). **A:** Expression von ABCG2 in Hodenzellen: von links nach rechts: testikuläre Stammzelle (TSC), Spermatogonie A (Type A), Spermatogonie B (Type B), Spermatozyte I (SC1), Spermatozyte II (SC2), Spermatische (ST). **B:** Expression von ABCG2 in Knochenmarkszellen: nicht aus der SP-Region stammende Zellen (BM-nSP), aus der SP-Region stammende Zellen (BM-SP).

In der Abbildung 19 ist die ABCG2-Expression der sortierten Zellen dargestellt. ABCG2 wurde bei einer Höhe von 327 Basenpaaren (bp) nachgewiesen. Das Knochenmark stellte die Positivkontrolle dar, denn für SP-Zellen aus dem Knochenmark ist eine ABCG2 Expression belegt (Kim 2002; Scharenberg 2002). Interne Kontrolle für das Knochenmark selbst bildete eine sortierte Gruppe von Zellen, die nicht aus der SP-Region stammten. Die Abbildung 19A zeigt die ABCG2-Expression in den sortierten Hodenzellpopulationen. Die Expression von ABCG2 war bei einer Bandenhöhe von 327 bp für testikuläre Stammzellen, Spermatogonien A, Spermatozyten I, Spermatozyten II und Spermatischen nachweisbar. In der Probe der Spermatogonien B fand sich keine ABCG2-Expression. Abbildung 19B zeigt die ABCG2-Expression in den sortierten Knochenmarkzellpopulationen. Die Expression des Gens ABCG2 war bei einer Bandenstärke von 327 bp für BM-SP Zellen zu sehen. In der Kontrollprobe BM-nSP wurde ABCG2 nicht nachgewiesen.

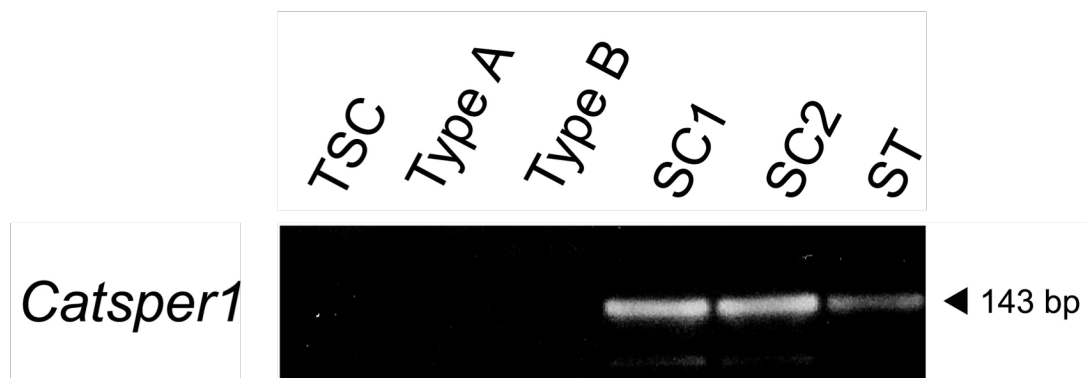
#### 4.5.2. c-Kit-Expression in Hodenzellen



**Abbildung 20. c-Kit-Expression.** Expression von c-Kit in Hodenzellen: von links nach rechts: testikuläre Stammzelle (TSC), Spermatogonie A (Type A), Spermatogonie B (Type B), Spermatozyte I (SC1), Spermatozyte II (SC2), Spermátide (ST). Die Banden weisen eine Stärke von 638 Basenpaaren (bp) auf.

Abbildung 20 zeigt die c-Kit-Expression der sortierten Hodenzellpopulationen. c-Kit wurde bei einer Bandenhöhe von 638 bp nachgewiesen. Eine Expression des Gens c-Kit war bei einer Bandenhöhe von 638 bp für Spermatogonien A, Spermatogonien B, Spermatozyten I und Spermatozyten II nachweisbar. In den Proben der testikulären Stammzellen und der Spermátiden war keine Expression nachweisbar.

#### 4.5.3. CatSper1 Expression in Hodenzellen

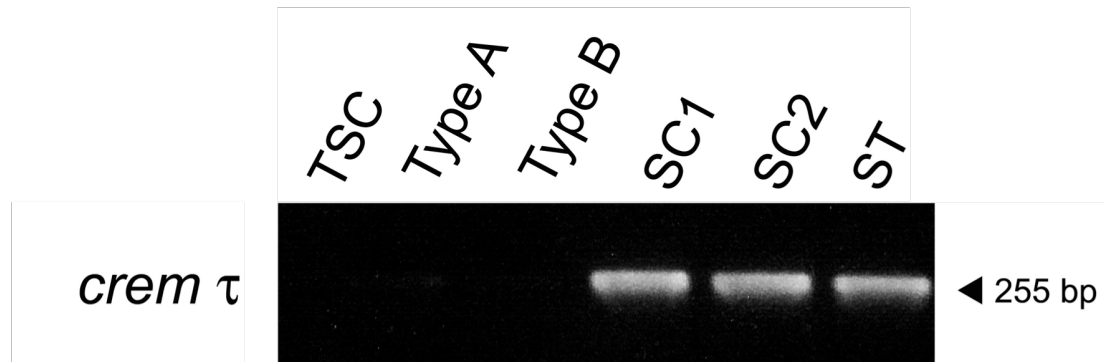


**Abbildung 21: CatSper1-Expression:** Expression von CatSper1 in Hodenzellen: von links nach rechts: testikuläre Stammzelle (TSC), Spermatogonie A (Type A), Spermatogonie B (Type B), Spermatozyte I (SC1), Spermatozyte II (SC2), Spermátide (ST). Die Banden weisen eine Stärke von 143 Basenpaaren (bp) auf.

Die Abbildung 21 stellt die Ergebnisse, der Untersuchungen der sortierten Hodenzellen, für die Genexpression von Catsper1 dar. Bei einer Höhe von 143 bp wurde die Expression von Catsper1 nachgewiesen und stellte sich bei den Spermatozyten I, Spermatozyten II und der Spermátiden positiv dar. Für die Zellgruppen der testikulären

Stammzelle, der Spermatogonien A und Spermatogonien B war keine CatSper1-Expression nachweisbar.

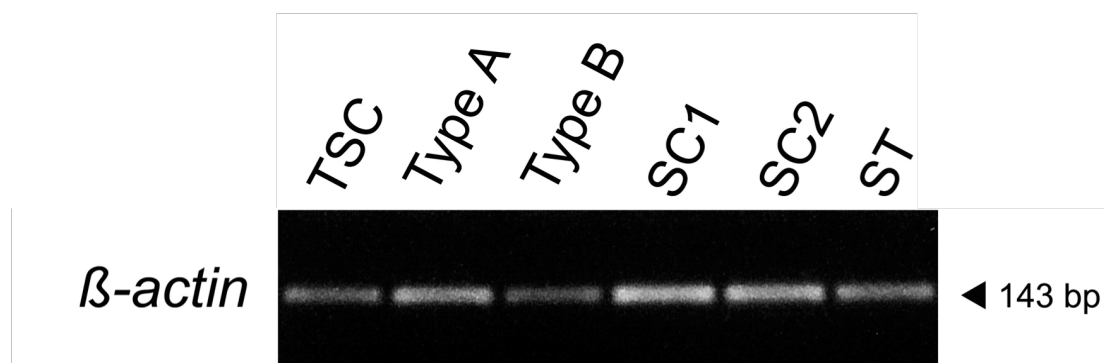
#### 4.5.4. CREM- $\tau$ -Expression in Hodenzellen



**Abbildung 22:** CREM- $\tau$ -Expression: Expression von CREM- $\tau$  in Hodenzellen: von links nach rechts: testikuläre Stammzelle (TSC), Spermatogonie A (Type A), Spermatogonie B (Type B), Spermatozyte I (SC1), Spermatozyte II (SC2), Spermatische (ST). Die Banden weisen eine Stärke von 255 Basenpaaren (bp) auf.

Abbildung 22 zeigt den Nachweis von CREM- $\tau$  in einer Höhe von 255 bp. Der Nachweis von CREM- $\tau$  war in den sortierten Hodenzellpopulationen von Spermatozyten I, Spermatozyten II und Spermatischen detektierbar. In den Proben der testikulären Stammzellen, der Spermatogonien A und Spermatogonien B war kein Nachweis einer CREM- $\tau$ -Expression darstellbar.

#### 4.5.5. $\beta$ -actin-Expression in Hodenzellen



**Abbildung 23:  $\beta$ -actin Expression:** Expression von  $\beta$ -actin in Hodenzellen: von links nach rechts: testikuläre Stammzelle (TSC), Spermatogonie A (Type A), Spermatogonie B (Type B), Spermatozyte I (SC1), Spermatozyte II (SC2), Spermatische (ST). Die Banden weisen eine Stärke von 143 Basenpaaren (bp) auf.



In der Abbildung 23 ist die  $\beta$ -actin-Expression der sortierten Hodenzellpopulationen dargestellt. Das  $\beta$ -actin war die interne Kontrolle der durchgeführten RT-PCRs. Der Nachweis von  $\beta$ -actin-Ereignissen zeigt, dass in der sortierten Hodenzellpopulation Zellen enthalten waren.  $\beta$ -actin wurde bei einer Höhe von 143 bp nachgewiesen. Eine Expression des Gens  $\beta$ -actin war bei einer Bandenstärke von 143 bp für alle Zellgruppen (testikuläre Stammzellen, Spermatozoen A und B, Spermatozyten I und II sowie für Spermatozoen) nachweisbar.

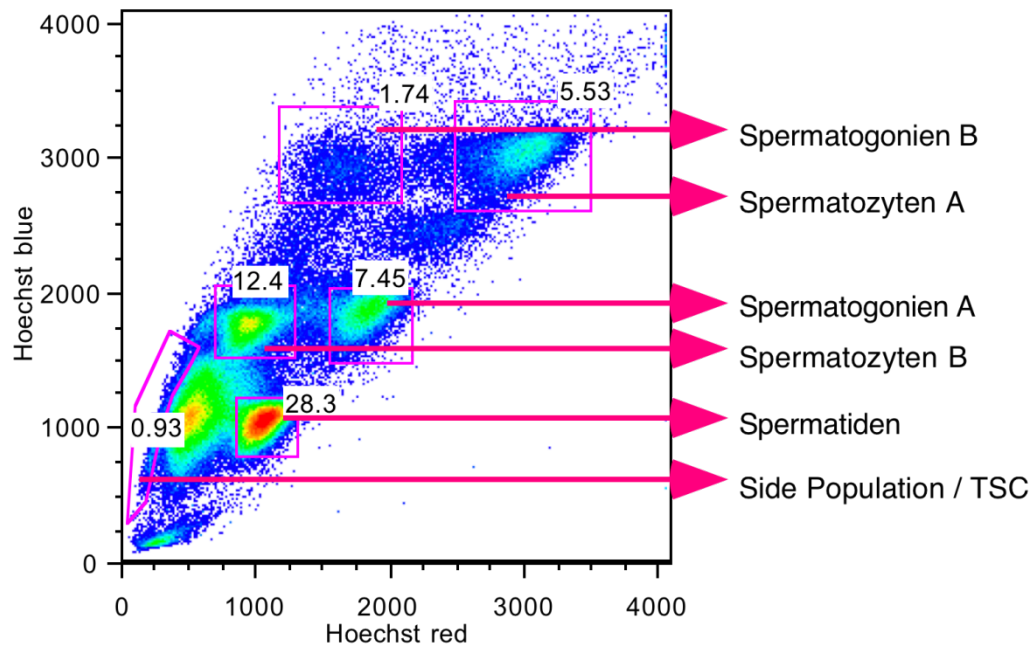
#### 4.6. Sortierprotokoll und Hodenzellpopulationen

Die vorangegangene Analyse der nach festgelegten Kriterien sortierten Zellen stellte eine differenzierte Unterteilbarkeit der verschiedenen Gruppen im Hoechstprofil dar und ermöglichte eine exakte Zuordnung der Hodenzellpopulationen zu bestimmten Merkmalen in der FACS-Analyse. Die spezifische Genexpression der Hodenzellpopulationen wurde mittels RT-PCR überprüft, um zu kontrollieren, ob distinkte Zellpopulationen eines Spermatogenesestadiums sortiert wurden. Die folgende Tabelle fasst diese Merkmale zusammen, ordnet die Hodenzellpopulationen anhand der gemessenen Parameter zu, und führt das Entwicklungsstadium-spezifische Gen auf, mit dem der Zugehörigkeitsnachweis erbracht wurde.

**Tabelle 7: Zuordnung der Hodenzellpopulationen zu Sortierkriterien der FACS-Analyse.** TSC= testikuläre Stammzelle; **Type A**= Spermatozoen Type A; **Type B**= Spermatozoen Type B; **SC I**= Spermatozyte I Ordnung; **SC II**= Spermatozyte II Ordnung; **ST**= Spermatozoid; **BM-SP**= Knochenmarkzellen aus der SP-Region; **BM-nSP**= Knochenmarkzellen nicht aus der SP-Region; **SSC**= Side Scatter; **FSC**=Forward Scatter; **DNA**= DNA-Gehalt (Ploidiegrad); **RT-PCR**= erwarteter Gennachweis mittels RT-PCR. Nicht bekannte Eigenschaften der Hodenzellen in der FACS-Untersuchung sind in der Tabelle mit “/“ markiert.

	SSC	FSC	Thy-1	$\alpha$ -6-int	c-Kit	DNA	Hoechst 33342-Fluoreszenz / Hoechstprofil	RT-PCR
<b>TSC</b>	lo	hi	hi	pos	neg	2n	niedrige blaue und rote / SP pos	ABCG2
<b>Type A</b>	/	/	/	pos	hi	2n	normale blaue und rote / mittig	c-Kit
<b>Type B</b>	/	/	/	pos	lo	4n	intensive blaue und normal rote	c-Kit
<b>SC I</b>	/	/	/	lo/neg	lo/neg	4n	intensive blaue und rote	CREM- $\tau$
<b>SC II</b>	/	/	/	neg	neg	2n	normale blaue und intensive rote	CREM- $\tau$
<b>ST</b>	/	/	/	neg	neg	1n	niedrige blaue und rote / SP neg	Catsper1
<b>BM-SP</b>	/	/	/	/	/	/	niedrige blaue und rote / SP pos	ABCG2
<b>BM-nSP</b>	/	/	/	/	/	/	SP neg	ABCG2 neg

Nach den durchgeführten Untersuchungen konnten die Zellgruppen, der SP-Hodenzellen bzw. testikulären Stammzellen, Spermatogonien A und B, die Spermatozyten I und II Ordnung und die Spermatisden im Hoechstprofil des Hodens benannt und entsprechend den Entwicklungsstadien der Hodenzellen zugeordnet werden, wie in der folgenden Abbildung 24 dargestellt.



**Abbildung 24: Lokalisation der Hodenzellpopulationen im Hoechstprofil.** Darstellung der Hodenzellpopulationen nach Hoechst 33342-Färbung. Die Abbildung zeigt die Lokalisation der Hodenzellpopulationen, SP-Hodenzellen/ TSC, Der Spermatogonien A und B, der Spermatozyten I und II Ordnung, sowie der Spermatisden im Hoechstprofil.

Die Unterteilung der oben genannten Hodenzellgruppen war im FACS anhand der Hoechst 33342-Fluoreszenz (Hoechst blue und Hoechst red) und der spezifischen Fluoreszenz von an Thy-1-,  $\alpha$ -6-integrin- und c-Kit-Antikörper gekoppelten Fluorchromen möglich.

Für die nach den Parametern,  $SSC^{lo}$ ,  $FSC^{hi}$ ,  $Thy-1^{hi}$ ,  $\alpha$ -6-int<sup>+</sup>, c-Kit<sup>-</sup>, Ploidiegrad=2n und niedrige blaue und rote Hoechst 33342-Fluoreszenz, im FACS sortierten SP-Hodenzellen wurde die Genexpression von ABCG2 nachgewiesen, was belegt, dass diese Zellgruppe testikuläre Stammzellen enthält. Die Expression von c-Kit bei den Hodenzellen, sortiert nach den Parametern  $\alpha$ -6-int<sup>+</sup>, c-Kit<sup>hi</sup>, Ploidiegrad=2n und normale blaue und rote Hoechst 33342-Fluoreszenz, beweist das Vorhandensein von Spermatogonien A. Die nach den Kriterien  $\alpha$ -6-int<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>, Ploidiegrad=4n und intensive blaue und normale rote Hoechst 33342-Fluoreszenz sortierten Hodenzellen weisen die Genexpression von c-Kit auf, was für Spermatogonien B charakteristisch ist. Der Nachweis von Spermatozyten I und II Ordnung erfolgte durch das Erheben der Genexpression von CREM- $\tau$ , wobei die Spermatozyten I nach den FACS-

Eigenschaften  $\alpha$ -6-int<sup>lo/-</sup>, c-Kit<sup>lo/-</sup>, Ploidiegrad = 4n, intensive blaue und rote Hoechst 33342-Fluoreszenz und die Spermatozyten II nach den FACS-Eigenschaften  $\alpha$ -6-int<sup>-</sup>, c-Kit<sup>-</sup>, Ploidiegrad=2n, normale blaue und intensive rote Hoechst 33342-Fluoreszenz sortiert worden waren. Die Population der Spermatiden stellte sich mit den Sort-Parametern negativ für alle Antikörper, Ploidiegrad=1n und niedrige blaue und rote Hoechst 33342-Fluoreszenz dar, was durch die Genexpression von Catsper1 nachgewiesen werden konnte.

Die für den FACS-Sort erarbeiteten und mittels semiquantitativer PCR überprüften Erkenntnisse, ermöglichen eine eindeutige Zuteilung und vorhersagbar Selektion von distinkten Hodenzellpopulationen.

## 5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, ein Protokoll zu erstellen, mit dem die Zellen der Spermatogenese (testikuläre Stammzellen bzw. SP-Zellen, Spermatogonien A und B, Spermatozyten I und II Ordnung sowie Spermatischen) vorhersagbar als homogene Population aus einer heterogenen Hodenzellsuspension gewonnen werden können. Die hierfür verwendete Methode war die FACS-Analyse bzw. der FACS-Sort, mit der die Zellen gleichzeitig anhand der Zelleigenschaften Vitalität, Größe, Ploidiegrad und Oberflächenantigenmuster untersucht werden konnten. Die Erfüllung dieser Unterscheidungskriterien ist ein Qualitätsmerkmal für eine Zell-Separationstechnik (Fawcett 1970; Dym 1973; Bellve´1977b).

### 5.1. Zellpopulationen des Hodens

#### 5.1.1. SP-Zellen/ Testikuläre Stammzellen

Die Auswahl der verwendeten Sortierparameter für testikuläre SP-Zellen beziehungsweise Stammzellen wurde in der Einleitung ausführlich beschrieben. Wie in der Abbildung 11 zu erkennen ist, können die von verschiedenen Autoren beschriebenen Eigenschaften der testikulären Zellen kombiniert untersucht werden, um potentielle Stammzellen aus einer heterogenen Einzelzellsuspension zu gewinnen (Shinohara 1999, 2000b; Kubota 2003; Falciatori 2004; Lassalle 2004; Bastos 2005; Challen 2006).

Für das murine Knochenmark ist bekannt, dass hämatopoetische Stammzellen ABCG2 stark exprimieren und deswegen im Hoechstprofil in der SP wiederzufinden sind (Kim 2002; Scharenberg 2002). Für die hier sortierten BM-SP-Zellen ist die ABCG2-Expression mittels RT-PCR eindeutig nachweisbar. Die Expression von ABCG2 lässt sich besonders bei Zellen beobachten, welche die Eigenschaft haben, eine SP im Hoechstprofil auszubilden (Zhou 2001, 2002). Der Nachweis von gleichen Merkmalen und biologischen Fähigkeiten blieb für Hoden-SP-Zellen und testikulären Stammzellen lange ungeklärt. So vermutet Asakura et al., dass die Zellen, die zur Ausbildung einer SP in verschiedenen Organen führen, zu einem hohen Anteil aus der hämatopoetischen Reihe stammen. Er zeigte, dass ausschließlich Zellen der hämatopoetischen Reihe und somit CD45-positive Zellen in der SP verschiedener Organe zu finden sind (Asakura 2002). Zum Widerlegen dieser Vermutung

untersuchten Kubota et al. und Falciatori et al. die Zellen der Hoden-SP und zeigten beide unabhängig voneinander, dass Zellen der SP negativ für die CD45-Expression sind und somit eindeutig nicht aus der hämatopoetischen Reihe stammen (Kubota 2003; Falciatori 2004). Kubota et al. konnte bei kryptorchiden Mäusen keine testikulären Stammzellen in der SP nachweisen (Kubota 2003). In weiteren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass Zellen aus der Hoden-SP Stammzellaktivität aufweisen (Lassalle 2004; Falciatori 2004, Challen 2006; Takubo 2008; Barroca 2009). Die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass uneinheitliche Definitionskriterien für Stammzellen verwendet wurden. Aktuelle Studien verwenden einheitliche Definitionskriterien als testikulären Stammzellmerkmale: erstens die Fähigkeit Tochterzellen zu bilden ("self-renewal") und zweitens die Fähigkeit in einem sterilen Hoden die Spermatogenese wieder zu beleben (Guan 2006; Seandel 2007; Orwig 2008; Barroca 2009; Kubota 2011; Shinohara 2011).

Die Ergebnisse unserer Sortierkriterien hinsichtlich der Charakterisierung der SP sind vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Autoren (Shinohara 2000b; Kubota 2003; Falciatori 2004; Lassalle 2004). Die bisher separat untersuchten Parameter wurden von uns im Sortierprotokoll zusammengefasst, so dass eine definierte Gruppe von Zellen mit folgenden Parametern sortiert werden konnte: niedriger SSC und hoher FSC (Shinohara 2000a, b), SP-positiv (Lassalle 2004; Falciatori 2004), hohe Expression von Thy-1 (Kubota 2003, 2011), hohe Expression von  $\alpha$ -6-integrin (Shinohara 1999, 2000a; Orwig 2008) und fehlende Expression von c-Kit (Shinohara 1999; 2000a; Kubota 2003; Falciatori 2004). Die semiquantitative Analyse der nach oben genannten Kriterien sortierten Zellen bestätigte, dass diese Zellen das ABCG2-Gen stark exprimieren, was das Vorliegen von testikulären Stammzellen wahrscheinlich macht (Zhou 2002; Lassalle 2004; Takubo 2008; Shinohara 2011). Der Vergleich der Genexpression von ABCG2 in Hoden-SP und Knochenmark-SP mittels RT-PCR unterstützt zusätzlich das Vorliegen testikulärer Stammzellen, da die Bandenhöhen von ABCG2 in der Hoden-SP und Knochenmark-SP nahezu identisch waren (Zhou 2001, Lassalle 2004).

### **5.1.2. Spermatogonien A**

Anders als in bisherigen Untersuchungen gelang es in dieser Arbeit eine 2n-Population im Hoechstprofil klar zu definieren. Die Lokalisation unterschied sich von der von Lassalle et al. beschriebenen. Sie lag getrennt von der SP und enthielt im Gegensatz zu den Arbeiten von Bastos keinen variierenden DNA-Gehalt zwischen 2n und 4n,

sondern ausschließlich einen DNA-Gehalt von  $2n$  (Lassalle 2004; Bastos 2005). Für die  $2n$ -Population konnte in dieser Arbeit in weiteren Analyseschritten zudem eine besonders starke Expression des c-Kit-Gens nachgewiesen werden, welche spezifisch für Spermatozoen A ist (Shinohara 2000a; Zhang 2011). Die Abgrenzung zu anderen diploiden Zellen der Spermatogenese erfolgte durch den Ausschluss einer CREM- $\tau$ -Expression, welche sich bei diploiden Spermatozyten II findet (Foulkes 1992; 1993). Desweiteren erfolgte in dieser Arbeit der Nachweis von  $\alpha$ -6-integrin mittels antigenspezifischer Markierung, wie in Abbildung 13 gezeigt.  $\alpha$ -6-integrin wurde bisher nicht als typisches Oberflächenantigen von Spermatozoen A beschrieben. Aufgrund der Ergebnisse wurden in dieser Arbeit folgende Sortierkriterien für Spermatozoen A festgelegt:  $2n$ -Population im Hoechstprofil, sehr hohe c-Kit-Expression (c-Kit<sup>hi</sup>) und klare  $\alpha$ -6-integrin Expression ( $\alpha$ -6-integrin<sup>+</sup>).

### 5.1.3. Spermatozoen B

In dieser Arbeit gelang in der FACS Analyse die strikte Abgrenzung einer  $4n$  Populationen. Weder Lassalle et al. noch Bastos et al. gelang eine Zuordnung der einzelnen tetraploiden Zellgruppen zu Hodenzellgruppen im Hoechstprofil (Lassalle 2004; Bastos 2005). Durch eine gezielte Voranreicherung von c-Kit positiven Zellen wie Spermatozoen A und B und Spermatozyten I mittels MACS (Vincent 1998; Schrans-Stassen 1999; Zhang 2011), gelang es in dieser Arbeit, die drei Populationen getrennt voneinander im Hoechstprofil darzustellen (Abbildung 24). In der  $4n$ -Population, die im Hoechstprofil etwas weiter links liegt und bei der noch kein Sprung in der Hoechst red Fluoreszenz stattgefunden hat, wurde in dieser Arbeit das Vorliegen von Spermatozoen B postuliert. Bei der Betrachtung der mit Fluorchromen markierten Antigene dieser Gruppe ließ sich in der Darstellung  $\alpha$ -6-integrin gegen c-Kit folgendes Expressionsmuster erkennen: Expression von  $\alpha$ -6-integrin positiv und Expression von c-Kit positiv. Bei der semiquantitativen Untersuchung der Zellen aus dieser  $4n$ -Population mittels RT-PCR war eine Expression von c-Kit nachweisbar (Abbildung 20), was Vorliegen von Spermatozoen B bestätigt (Vincent 1998; Schrans-Stassen 1999; Zhang 2011). Eine Expression des Gens CREM- $\tau$  ist in dieser Population nicht nachweisbar (Abbildung 22), was das Vorliegen von tetraploiden Spermatozyten I ausschließt (Foulkes 1992, 1993).

#### 5.1.4. Spermatozyten I

Im Hoechstprofil fand sich neben der Gruppe der Spermatogonien B eine weitere Gruppe von tetraploiden Zellen, die durch einen Sprung in der Hoechst red Fluoreszenz nach rechts verschoben ist. Diese Position im Hoechstprofil spricht für einen DNA-Gehalt von  $4n$ , wie bereits von Bastos beschrieben (Bastos 2005). Bei der Betrachtung der mit Fluorchromen markierten Antigene ließ sich in der Darstellung  $\alpha$ -6-integrin gegen c-Kit in der Abbildung 15 folgendes Expressionsmuster für die Zellen dieser Hodenzellgruppe erkennen: schwache Expression von  $\alpha$ -6-integrin ( $\alpha$ -6-intgrin<sup>lo/-</sup>) und schwache Expression von c-Kit (c-Kit<sup>lo/-</sup>), welche als Sortierkriterien in das Sortierprotokoll aufgenommen wurden. Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR dieser Zellgruppe zeigten eine Expression von c-Kit sowie von CREM- $\tau$  (Abbildung 20, Abbildung 22), welche für spezifisch für Spermatozyten I sind (Foulkes 1992, 1993; Vincent 1998; Schrans-Stassen 1999; Lassalle 2004; Zhang 2011).

#### 5.1.5. Spermatozyten II

Wie bereits von anderen Autoren beschrieben, ließ sich im Hoechstprofil eine  $2n$ -Population darstellen (Lassalle 2004; Bastos 2005). Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich dieser Zellgruppe die Spermatozyten II zuordnen. Bei der Betrachtung der mit Fluorchromen markierten Antigene zeigte sich in der Darstellung  $\alpha$ -6-integrin gegenüber c-Kit (Abbildung 16) folgendes Expressionsmuster: eine schwache bis nicht registrierbare Expression von  $\alpha$ -6-integrin ( $\alpha$ -6-intgrin<sup>-</sup>) und eine schwache bis nicht registrierbare Expression von c-Kit (c-Kit<sup>-</sup>). Die Analyse hinsichtlich des Genexpressionsmusters mittels semiquantitativer RT-PCR war übereinstimmend mit den Beobachtungen anderer Autoren und zeigte eine nur niedrige c-Kit Expression (Abbildung 20), welche in Zusammenhang mit der Herabregulierung der Expression von c-Kit mit zunehmendem Reifestadium der Zellen der Spermatogenese gebracht wird (Packer 1995; Vincent 1998). Die mittels semiquantitativer RT-PCR gemessene CREM- $\tau$ -Expression dieser Zellgruppe (Abbildung 22) stimmte mit den Ergebnissen von Foulkes und Sassone-Crosi überein (Foulkes 1993; Sassone-Crosi 1998; Lassalle 2004).

#### 5.1.6. Spermatisden

Die Population der haploiden Spermatisden ist, wie bereits auch von anderen Autoren beschrieben, im Hoechstprofil gering gefärbt und rechts neben der SP sowie unterhalb

der 2n-Population lokalisiert (Lassalle 2004; Bastos 2005). Nach der Markierung der Zellen mit Fluorchromen ließ sich in der Darstellung  $\alpha$ -6-integrin gegenüber c-Kit (Abbildung 17) weder eine Expression von  $\alpha$ -6-integrin ( $\alpha$ -6-intgrin) noch eine Expression von c-Kit (c-Kit) messen. Die Analyse der sortierten Zellen mittels semiquantitativer RT-PCR bestätigte die Beobachtung der FACS-Analyse, da in dieser Zellgruppe mittels RT-PCR keine c-Kit Expression mehr nachweisbar war (Abbildung 20). Eine CREM- $\tau$ -Expression wurde in dieser Arbeit entsprechend den Ergebnisse von Foulkes und Lassalle et al. registriert (Abbildung 22) (Foulkes1993; Lassalle 2004). Der Nachweis einer CatSper1-Expression (Abbildung 21) war ebenfalls positiv passend zu der Annahme, dass CatSper1 essentiell für die Funktion von Spermien ist (Ren 2001; Carlson 2003).

## 5.2. Techniken

Die vorhersagbare Isolation homogener Zellgruppen aus einer heterogenen Einzelzellsuspension nach festgelegten Parametern ist die Voraussetzung für detaillierte Untersuchungen von Zelleigenschaften, Zell-Zell-Interaktionen und Zellfunktionen bei in vitro Untersuchungen.

Die Tubuli seminiferi sind der Ort der Spermatogenese, wo ein Kontinuum von Reifungsprozessen abläuft, was Stammzellen zu Spermatischen heranreifen lässt (Fawcett 1970; Dym 1973). Diese morphologisch einmalige und komplexe Struktur ließ Bellvé anspruchsvolle Qualitätsmerkmale an eine Separationstechnik der Hodenzellen formulieren. So war die Zielsetzung, innerhalb einer Hodenzellfraktion eine maximale Zellausbeute vitaler und morphologisch intakter Zellen ohne Kontamination durch tote Zellen und zelluläre Trümmer zu erhalten (Bellvé 1977b). Die von Bellvé et al. beschriebene Separationstechnik, mittels eines BSA-Konzentrationsgradienten über vier Stunden bei 4°C und einer Sedimentationsgeschwindigkeit von einem G die Hodenzellen aufzuteilen, stellt die erste beschriebene und funktionierende Separationsmethode dar (Bellvé 1977a). Vorteile dieses Verfahrens sind, dass es einfach zu handhaben ist und ohne großen apparativen Aufwand funktioniert. Außerdem sind die genutzten Lösungen und Reagenzien Bestandteile einer jeden Laborgrundausrüstung und kostengünstig von diversen Anbieter zu beziehen. Die Nachteile dieses Verfahrens sind jedoch erheblich, da sie große Schwierigkeiten der Hodenzellfraktionierung mit sich bringen: Abhängig vom Alter der Maus und damit einhergehender zunehmender Differenzierung des Hodengewebes kommt es zu einer



steigenden Kontamination der Proben mit Sertolizellen, was die Unterscheidung der Hodenzellen unter dem Mikroskop erschwert (Bellvé 1977a). Die Fraktionierung der Proben bei dieser Methode ist ungenau, da das gesamte Volumen des Sedimentationsgradienten in kleine Unterproben aufgeteilt wird, ein Aliquot aus jeder Probe entnommen und unter dem Mikroskop betrachtet wird. Anschließend werden die Proben, die unter dem Mikroskop morphologisch gleich erscheinen, wieder zusammengefügt. Bei diesem Verfahren unterliegt die Fraktionierung der Proben einer hohen Subjektivität, welche von der Erfahrung des Betrachters und von den im betrachteten Bereich liegenden Zellen abhängig ist. Die Zugehörigkeit zu Zellgruppen erfolgt visuell für größere Zellgruppen und nicht jede Zelle kann einzeln zugeordnet werden.

Das Verfahren, das von Lassalle et al. und Bastos et al. beschrieben wurde, stellt eine objektivere Methode dar, um Zellen zu separieren. Beide nutzten die Eigenschaften von Hoechst 33342 um die Hodenzellen anhand ihres DNA-Gehalts in der FACS-Analyse voneinander zu unterscheiden (Lassalle 2004; Bastos 2005). Eine Einteilung der Hodenzellen mittels FACS scheint eine gute Möglichkeit zu bieten, die oben genannten Anforderungen an eine Separationstechnik zu erfüllen (Geisinger 2010). Die Untersuchung der Zellen mittels FACS ermöglicht die Berücksichtigung jeder einzelnen Zelle. Durch die Eigenschaft der SP-Zellen, Hoechst 33342 wieder aus der Zelle heraus zu transportieren, ist eine Unterteilung der Zellen in die Zellgruppen SP-Zellen, diploide, tetraploide und haploide Zellen möglich (Lassalle 2004, Bastos 2005). Desweiteren können zusätzliche Zellparameter, wie Zellgröße, Zellkerngröße und Zellgranularität genutzt werden, um Zellen mittels FACS genauer zu unterscheiden (Malkov 1998; Rodríguez-Casuriaga 2011). Im Gegensatz zu der beschriebenen Methode von Bellvé ist der apparative Aufwand bedeutend höher, denn für die Unterscheidung der Hodenzellen anhand der oben genannten Eigenschaften ist ein FACS-Gerät nötig und für die Untersuchung der Hoechstfluoreszenz sogar ein FACS-Gerät mit einem ultra-violetten Laser (UV-Laser). Schwachpunkt bei der Unterscheidung der Hodenzellen anhand von Zellgröße, Zellkerngröße, Zellgranularität und Ploidiegrad ist, dass es nur schwer oder nicht möglich ist Zellpopulationen gleicher Morphologie und gleichen DNA-Gehalts voneinander zu unterscheiden. Da die Unterscheidung anhand von Morphologie und Struktur mittels Mikroskop (Bellvé 1977a, b), sowie weiterhin anhand des DNA-Gehalts (Malkov 1998; Lassalle 2004; Bastos 2005; Rodríguez-Casuriaga 2011) keine eindeutige Trennung der Zellen möglich macht, müssen weitere Zellparameter, wie zum Beispiel Zelloberflächenantigene, zur Zelldifferenzierung untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich die Hodenzellen hinsichtlich ihrer Antigenexpressionsmuster separieren lassen. Die Auswahl der verwendeten Antikörper zur Markierung von Oberflächenantigenen erfolgte anhand bereits veröffentlichter Ergebnisse anderer Autoren. Die Antikörper anti- $\alpha$ -6-integrin, anti-c-Kit und anti-Thy-1 wurden bereits zur Hodenstammzellcharakterisierung genutzt (Vincent 1998; Shinohara 2000, Kubota 2003, Lassalle 2004; Falciatori 2004). In dieser Arbeit wurde das Expressionsmuster der weiteren Hodenzellpopulationen der Spermatogenese untersucht.

Vor der Durchführung der eigentlichen Separationsanalyse mittels FACS erfolgte zudem eine Zellanreicherung mittels MACS für bestimmte Zellgruppen, die nur in geringer Anzahl in einer Probe vorhanden waren. Die MACS-Methode wurde bereits von Shinohara und Kubota genutzt, um testikuläre Stammzellen anzureichern (Kubota 2003; Shinohara 2000a). Auch in dieser Studie konnten testikuläre Stammzellen anhand von Thy-1 und  $\alpha$ -6-integrin angereichert werden. Darüber hinaus war es uns auch möglich, Spermatogonien B mittels MACS Voranreicherung anhand des Oberflächenantigens  $\alpha$ -6-Integrin anzureichern (Abbildung 9). Weiterhin konnten mittels MACS auch Zellen, die c-Kit exprimieren, angereichert werden. In diesen Zellpopulationen konnten wir insbesondere Spermatogonien A und B nachweisen (Abbildung 10). Die Anwendung der MACS vor der FACS-Analyse ermöglichte eine Unterteilung der 4n-Population im Hoechstprofil in 2 Fraktionen (Abbildung 24).

Das erarbeitete Protokoll aus der Kombination von Hoechstprofil und Antigenexpression ermöglichte es, alle sechs Zellpopulationen der Spermatogenese objektiv und reproduzierbar zu separieren. Die Genexpressionsmuster der sortierten Hodenzellpopulationen bewies, dass anhand der im Sortierprotokoll benannte Kriterien TSC, Spermatogonien A und B, Spermatozyten I und II Ordnung sowie Spermatischen gezielt sortiert werden können. Damit ist die vorgestellte Technik eine klare Verbesserung zu den bisher beschriebenen Zellseparationsverfahren. Ein Vorteil der von uns vorgestellten Methode im Vergleich zu der von Bellvé beschriebenen ist, dass jede Zelle einzeln und objektiv durch die FACS-Analyse betrachtet wird (Bellvé 1977 a, b). Zusätzlich ist es möglich, durch die Verwendung von Antikörpern gegen Oberflächenantigene Zellgruppen gleichen DNA-Gehalts in weitere Populationen zu unterteilen (Lassalle 2004; Bastos 2005). Allerdings fordert diese neu Methode einen sehr hohen apparativen Aufwand: Neben dem FACS-Gerät, welches auch bei den Methoden von Lassalle und Bastos genutzt wurde, wird auch der MACS<sup>®</sup> MultiStand benötigt. Für die Zellanreicherung mittels MACS und die Antigenmarkierung mittels spezifischer Antikörper werden zudem teure Laborreagenzien gebraucht, so dass die

vorgestellt Methode im Vergleich mit den herkömmlichen Verfahren mit deutlich höheren Kosten verbunden ist.

Ungeachtet des hohen apparativen Aufwands und der Kostenintensität ist es in dieser Arbeit gelungen, die Anforderungen, die Bellvé an die Methodik zur Fraktionierung von Zellen aufstellte, vollständig zu erfüllen (Bellvé 1977). Die Zielsetzung dieser Studie konnte erreicht werden und bahnt den Weg für weiterführende detaillierte Untersuchungen an jeder einzelnen Hodenzellgruppe.

### **5.3. Kritische Betrachtung**

Die Überprüfung der Genexpression der von uns sortierten Zellgruppen der Spermatogenese, entsprach den bisher veröffentlichten Ergebnissen: ABCG2 war auf testikulären Stammzellen und Spermatogonien A eindeutig nachweisbar (Lassalle 2004). Das Expressionsmuster von c-Kit in war identisch mit den beschriebenen Ergebnissen von Vincent (Vincent 1998). Wie in den Arbeiten von Foulkes wurde die CREM- $\tau$ -Expression in dieser Arbeit ab dem Reifestadium der Spermatozyten I nachgewiesen (Foulkes 1992, 1993). CatSper1 war ab dem Reifestadium der Spermatozyten nachweisbar. Dies entspricht der Theorie von Ren und Carlson, dass Spermatisden, für die dieses Funktionsprotein essentiell ist, von Zellen früherer Zellstadien mit diesem Protein ausgestattet werden, da sie selbst keine Proteinbiosynthese mehr betreiben können (Ren 2001; Carlson 2003). Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien wurde in dieser Arbeit eine ABCG2-Expression auf Spermatozyten I und II sowie auf Spermatisden nachgewiesen. Spermatisden B hingegen exprimierten kein ABCG2. Die Vergleichbarkeit der Expressionsmuster von CatSper und ABCG2 lässt vermuten, dass ABCG2 nicht nur eine besondere Funktion bei der Entwicklung der Spermatisde, sondern auch eine direkte Spermatisdenfunktion hat. Eine funktionelle Aktivität von ABCG2 konnte bereits auf Spermatozoen nachgewiesen werden, allerdings ist sie dort weder an der Kapazitationsreaktion noch an der akrosomalen Reaktion beteiligt (Scharenberg 2009). Vermutet wird, dass ABCG2 eine Schutzfunktion für Spermatozoen vor zytotoxischen Substanzen übernimmt, da ABC-Transportern bekanntermaßen, zytotoxische Substanzen aus Zellen heraus transportieren, was sowohl für entartete Gewebe als auch für gesunde Gewebe beschrieben ist (Gottesman 2002; Robey 2007). Die Vermutung, dass ABCG2 eine Schutzfunktion für Spermatozoen übernimmt, wird dadurch gestärkt, dass ABCG2 in Blut-Hirn-Schranke, Plazenta und Blut-Hoden-Schranke exprimiert wird, welche alle natürliche Schranken des Körpers darstellen, die eine Schutzfunktion von Geweben

übernehmen sollen (Schinkel 1996; Enokizono 2007; Mao 2008). Weiterhin wird in Geweben wie Lunge und Darm, die zytotoxischen Substanzen stark exponiert sind, der ABCG2-Transporter besonders stark exprimiert (Fetsch 2006; Robey 2007). Auch in Ovarien und Hoden wird ABCG2 exprimiert. Beide Organe sind für die Reproduktion und somit für die Arterhaltung essentiell (Schuetz 1999; Lassalle 2004). Nach Robey et al. besteht die Hauptaufgabe des ABCG2-Transporters, der in vielen Geweben nachgewiesen ist, darin diese Gewebe vor körperfremden Stoffen zu schützen. Körperfremde Stoffe sind Medikamente, wie Antibiotika oder Mitoxantron, oder Toxine. Weiterhin transportiert ABCG2 auch Moleküle wie Phytoöstrogen (Janvilisri 2005, Robey 2007; Enokizono 2008). Phytoöstrogen und andere xenobiotische Substanzen haben einen negativen Einfluss auf die Funktion der Zelle, so können sie den Zellstoffwechsel erheblich stören oder die genetische Information der Zelle nachhaltig verändern. ABCG2 Transporter reduzieren die Konzentration der Xenobiotika in der Zelle, durch gerichteten ATP-abhängigen Transport aus der Zelle heraus (Robey 2007). Diese Beobachtungen lassen die Hypothese aufkommen, dass ABC-Transporter auf Spermatozyten funktionell aktiv sind und ebenfalls zu späteren Zeitpunkten der Reifungsphasen das Erbgut vor negativen Einflüssen und Veränderungen durch Toxine und Xenobiotika schützen.

#### **5.4. Ausblick**

Die stetige Neubildung von Spermatozyten, aus einer geringen Menge von Stammzellen über einen langen Zeitraum macht die Spermatogenese zu einem besonderen Prozess. Diverse Regelmechanismen sind notwendig, wie Zell-Zell-Interaktion, Hormone und Wachstumsfaktoren, damit durch mitotische und meiotische Teilung aus einer testikulären Stammzelle Spermatozyten entstehen können (Kubota 2004b; O'Shaughnessy 2009; Cheng 2010; Riboldi 2012).

Das Verständnis von Zell-Zell-Interaktionen und deren Funktion im Hoden ist eine wichtige Voraussetzung für den Zugang zu neuen therapeutischen Methoden, zum Beispiel für Sterilitätsbehandlungen. Um diese Funktionen im Hoden genau untersuchen zu können, müssen Zellen eindeutig isoliert werden können. Neben der klaren Charakterisierung der Zellen der Spermatogenese in dieser Arbeit ist weiterhin wichtig Leydig- und Sertolizellen eindeutig identifizieren zu können, da sie die Spermatogenese mit beeinflussen (O'Shaughnessy 2009; Cheng 2010). Hierzu wurde von Chang et al. eine Methode vorgestellt, welche auf einer Sedimentationstechnik beruht, bei der Zellen durch Abfiltrieren selektiert werden (Chang 2011). Großer Nachteil

dieser Methode ist, dass Sertoli- und Leydigzellen nicht eindeutig charakterisiert sind und somit nicht vorhersagbar isoliert werden können. Die Reinheit der sortierten Zellgruppe ist maßgeblich von der Erfahrung und Geschick der durchführenden Person abhängig, ähnlich wie bei der von Bellvé et al. vorgestellte Methode für Zellen der Spermatogenese (Bellvé 1977a). Durch die Markierung interzellulärer Fetttröpfchen mittels Nile red, einem Fluorchrom, das an Fette bindet (Greenspan 1985), ist die Isolation von Sertolizellen mittels FACS für den menschlichen Hoden bereits vorhersagbar und eindeutig möglich (Chui 2011).

Die Bedeutung sowie die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen der Zellen der Spermatogenese wird durch die Studien von Guan et al. und Seandel et al. dargestellt. Beide Forschungsgruppen untersuchten die Fähigkeiten testikulärer Stammzellen sich zu differenzieren. Der Nachweis von testikulären Stammzellen wurde durch Transplantation in einen sterilen Hoden mit wiederbeginnender Spermatogenese erbracht. Des Weiteren wurde von beiden Autoren beschrieben, dass testikuläre Stammzellen, die in Zellkultur passagiert worden sind nach subkutaner Injektion zu 100% Teratome bilden, die nachweislich Anteile von Ectoderm, Endoderm und Mesoderm enthalten (Guan 2006; Seandel 2007). Über die Mechanismen, wie testikuläre Stammzellen zu Eigenschaften pluripotenter embryonaler Stammzellen kommen (Guan 2006) oder zu Eigenschaften multipotenter Stammzellen (Seandel 2007) bleibt ungeklärt.

Die Arbeit von Barroca et al. stellt zwei besondere Fähigkeiten testikulärer Stammzellen dar. Das "self-renewing-" Potential der testikulären Stammzellen ist die Voraussetzung, dass aus einer kleinen Gruppe von Stammzellen kontinuierlich ein Vielfaches an Zellen der Spermatogenese hervorgehen kann. Dieses Potential ist ein wesentliches Charaktermerkmal von testikulären Stammzellen (Barroca 2009). Ein weiteres Charaktermerkmal der testikulären Stammzellen ist die Fähigkeit nach Transplantation derselben in einen sterilen Hoden, die Spermatogenese wieder beginnen zu lassen (Brinster und Zimmermann 1994). Diese Merkmale überprüften Barroca et al., in dem sie nach Zelltransplantation eine Periode von ca. zwei Spermatogenesezyklen abwarteten, um auszuschließen, dass die wiederbeginnende Spermatogenese durch differenzierte Spermatogonien A erzielt wurde und um damit zu belegen, dass der Wiederbeginn auf sich teilenden testikulären Stammzellen beruht. Die transplantierten Zellen wurden nach folgenden Kriterien mittels FACS-Sort gewonnen: SP<sup>+</sup>;  $\alpha$ -6-Integrin<sup>+</sup>; c-Kit<sup>low/-</sup> (Barroca 2009). Kubota et al. transplantierten Zellen, die nach folgenden Kriterien mittels FACS-Sort gewonnen wurde: "Major

Histocompatibility Complex I negativ“ (MHC I<sup>-</sup>); Thy-1<sup>+</sup>;  $\alpha$ -6-Integrin<sup>+</sup> (Kubota 2004a). Für beide Zellgruppen wurde eine ähnliche Stammzellaktivität nachgewiesen (Kubota 2004a; Barroca 2009).

Der Vergleich der FACS-Sort Kriterien für testikuläre Stammzellen beider Studien mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigt, dass die FACS-Sort-Parameter für testikuläre SP-Zellen bzw. Stammzellen dieser Studie (SP<sup>+</sup>; Thy-1<sup>+</sup>;  $\alpha$ -6-Integrin<sup>+</sup>; c-Kit<sup>-</sup>), mit Ausnahme von MHC I, alle Kriterien der beiden Studien berücksichtigt (Kubota 2004a; Barroca 2009). Es erscheint daher sinnvoll, in weiteren Studien die Stammzellaktivität der Zellen, isoliert anhand der Sortierkriterien dieser Arbeit, zu überprüfen.

Die Vermutung von Guan et al., dass testikuläre Stammzellen durch eine genetische Reprogrammierung Eigenschaften embryonaler Stammzellen annehmen (Guan 2006) und der Nachweis durch Barroca et al., dass frühe Spermatogonien A in der Lage sind sich nach Transplantation in einen sterilen Hoden zu testikulären Stammzellen zurück zu differenzieren (Barroca 2009), zeigt deutlich, wie wichtig weiterer Untersuchungen der Hodenzellen zum Verständnis solcher Prozesse sind. Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft für medizinische Behandlungen genutzt werden. Möglicherweise stellen die testikulären Stammzellen ein alternatives Reservoir für regenerative Zelltherapien dar (Guan 2006; Seandel 2007; Barroca 2009).

Protokolle zur gezielten Isolation von Hodenzellen haben nicht nur für die Forschung eine enorme Bedeutung, sondern sind ebenfalls ein wichtiger Grundstein für mögliche Therapiekonzepte. Die Krankheitsbilder der obstruktiven und nicht obstruktiven Azoospermie sind der vorrangige Grund von männlicher Infertilität. Im Rahmen der Kinderwunschbehandlung für eine intrazytoplasmatische Spermieninjektion (ICSI) wird bei Patienten mit einer obstruktiven Azoospermie eine Spermientnahme durch Hodenpunktion vorgenommen (Devroey 1994; Weidner 2002). Bei der nicht-obstruktiven Azoospermie kommt es zu einem Stillstand der Spermatogenese, so dass keine Spermien gebildet werden. Für Patienten mit einer nicht-obstruktiven Azoospermie kann der Kinderwunsch nur durch Spenderspermien erfüllt werden (Diedrich 2011). Riboldi extrahierte aus humanem Hodengewebe testikuläre Stammzellen und Sertolizellen mittels FACS um in vitro testikuläre Stammzellen zu Spermiden heranreifen zu lassen. Die testikulären Stammzellen wurden anhand von Oberflächenantigenen isoliert, die durch an Fluorochrome gekoppelte Antikörper markiert sind. Ein detektiertes Oberflächenantigen war  $\alpha$ -6-integrin, was auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde um testikuläre Stammzellen mittels FACS zu

sortieren (Golestaneh 2009; Riboldi 2011). Für die Isolation der Sertolizelle mittels FACS wurde, wie zuvor beschrieben, Nile red genutzt (Chui 2011). Beide Zellpopulationen von Patienten mit einer nicht obstruktiven Azoospermie wurden zusammen kultiviert und nach fünf Tagen war der Nachweis von haploiden Zellen möglich (Riboldi 2011).

Die strikte Unterteilung von Zellpopulationen in einem Organ, wie dem Hoden, wo eine heterogene Gewebestruktur vorliegt, bildet eine wichtige Voraussetzung für gezielte biologische und medizinische Untersuchungen. Die Unterteilung der Hodenzellen anhand ihres Ploidiegrades und ihrer Zelloberflächenantigenpräsentation mittels FACS stellt eine objektive Zellseparationsmethode vor. Die hier vorliegende Arbeit definiert FACS-Parameter anhand derer die Zellen der Spermatogenese eindeutig und vorhersagbar isoliert werden können, was gezielte Untersuchungen an testikulären SP bzw. Stammzellen, Spermatogonien A und B , Spermatozyten I und II Ordnung, sowie Spermatischen ermöglicht.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Allikmets R, Schriml LM, Hutchinson A, Romano-Spica V, Dean M (1998) A human placenta-specific ATP-binding cassette gene (ABCP) on chromosome 4q22 that is involved in multidrug resistance. *Cancer Res.* 58: 5337–5339
2. Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM (1999) Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:361-98
3. Anderson R, Fassler R, Georges-Labouesse E, Hynes RO, Bader BL, Kreidberg JA, Schaible K, Heasman J, Wylie C (1999). Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development* 126: 1655-1664
4. Ando T, Kusuhara H, Merino G, Alvarez AI, Schinkel AH, Sugiyama, Y (2007) Involvement of Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) in the Biliary Excretion Mechanism of Fluoroquinolones. *Drug Metab. Dispos.* 35: 1873-1879
5. Arndt-Jovin DJ, Jovin T (1977) Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. *J Histochem Cytochem* 25:585
6. Asakura A, Rudnicki M (2002). Side population cells from diverse adult tissues are capable of in vitro hematopoietic differentiation. *Exp Hematol.* 30(11):1339-45
7. Austin CR (1952). The capacitation of the mammalian sperm. *Nature.* 170(4321):326
8. Barroca V, Lassalle B, Coureuil M, Louis JP, Le Page F, Testart J, Allemand I, Riou L, Fouchet P (2009). Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells in vivo. *Nat Cell Biol.* 11(2):190-6.
9. Bart J, Hollema H, Groen HJ, de Vries EG, Hendrikse NH, Sleijfer DT, Wegman TD, Vaalburg W, van der Graaf WT (2004) The distribution of drug-efflux pumps, P-gp, BCRP, MRP1 and MRP2, in the normal blood–testis barrier and in primary testicular tumours. *Eur J Cancer* 40: 2064–2070
10. Bastos H, Lassalle B, Chicheportiche A, Riou L, Testart J, Allemand I, Fouchet P (2005) Flow cytometric characterization of viable meiotic and postmeiotic cells by Hoechst 33342 in mouse spermatogenesis. *Cytometry Part 65A:* 40-49
11. Bellvé AR, Millette CF, Bhatnagar YM, O'Brien DA (1977a) Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *J Histochem Cytochem.* 7: 480-94



12. Bellvé AR, Cavicchia JC, Millette CF, O'Brien DA, Bhatnagar YM, Dym M (1977b) Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J Cell Biol.* 1: 68-85
13. Bennett MD (1977). The time and duration of meiosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1977 Mar 21;277(955):201-26
14. Brinster RL, Avarbock MR (1994). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 11303-11307
15. Brinster RL, Zimmermann JW (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 11298-11302
16. Bucci LR, Meistrich ML (1987) Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations. *Mutat Res.* 176:259-68
17. Bunting KD, Zhou S, Lu T, Sorrentino BP (2000) Enforced P-glycoprotein pump function in murine bone marrow cells results in expansion of side population stem cells in vitro and repopulating cells in vivo. *Blood.* 96(3):902-9
18. Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, Clapham DE, Hille B, Garbers DL, Babcock DF (2003). *CatSper1* required for evoked Ca<sup>2+</sup> entry and control of flagellar function in sperm. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(25)
19. Challen GA, Little MH (2006) A side order of stem cells: The SP phenotype. *Stem Cells* 24:3-12
20. Chang YF, Lee-Chang JS, Panneerdoss S, MacLean JA 2nd, Rao MK (2011). Isolation of Sertoli, Leydig, and spermatogenic cells from the mouse testis. *Biotechniques.* 51(5):341-2, 344
21. Chaudhary PM, Roninson IB (1991) Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell.* 66: 85-94
22. Cheng CY, Mruk DD (2010). A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nat Rev Endocrinol.* 6(7):380-95.
23. Chui K, Trivedi A, Cheng CY, Cherbavaz DB, Dazin PF, Huynh AL, Mitchell JB, Rabinovich GA, Noble-Haeusslein LJ, John CM (2011). Characterization and functionality of proliferative human Sertoli cells. *Cell Transplant.* 20(5):619-35
24. Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F, Scherrmann JM (2004) Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein ABCG2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res.* 64: 3296–3301

25. Chiarini-Garcia H, Russell LD (2001) High-Resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 65:1170-1178
26. Cole SPC et al. (1993) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258: 1650-1654
27. Dean M & Allikmets R (1995) Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev.* 5(6):779-85
28. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily, *Genome Res.* 11: 1156–1166.
29. Dean PM, Jett JH (1974) Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. *J Cell Biol* 60: 523
30. de Jonge HJ, Fehrmann RS, de Bont ES, Hofstra RM, Gerbens F, Kamps WA, de Vries EG, van der Zee AG, te Meerman GJ, ter Elst A (2007). Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS One.* 2(9): e898
31. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC (1994). Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 62(3):639-41
32. Diedrich K, Fauser BC, Devroey P; Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group 2009 (2011). Cancer and fertility: strategies to preserve fertility. *Reprod Biomed Online.* 22(3):232-48
33. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y (1998) A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15665–15670
34. Dym M (1973). The fine structure of the monkey (*Macaca*) Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *Anat Rec.* 175(4): 639-56
35. Enokizono J, Kusuhara, H, Sugiyama (2007) Effect of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) on the Disposition of Phytoestrogens *Mol Pharmacol* 72: 967-975
36. Enokizono J, Kusuhara H, Ose A, Schinkel AH, Sugiyama Y (2008) Quantitative Investigation of the Role of Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp/Abcg2) in Limiting Brain and Testis Penetration of Xenobiotic Compounds. *Drug Metab Dispos.* 36: 995-1002
37. Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch TP, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien RW, Catterall WA (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 25(3): 533-5

38. Everaert BR, Boulet GA, Timmermans JP, Vrints CJ (2011). Importance of suitable reference gene selection for quantitative real-time PCR: special reference to mouse myocardial infarction studies. *PLoS One*. 6(8): e23793.
39. Falciatori I, Borsellino G, Haliassos N, Boitani C, Corallini S, Battistini L, Bernardi G, Stefanini M, Vicini E (2004). Identification and enrichment of spermatogonial stem cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis. *FASEB J*. 18(2):376-8.
40. Fawcett DW, Leak LV, Heidger PM Jr (1970). Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. *J Reprod Fertil Suppl*. 10: 105-22
41. Fetsch PA, Abati A, Litman T, Morisaki K, Honjo Y, Mittal K, Bates SE (2006) Localization of the ABCG2 mitoxantrone resistance-associated protein in normal tissues. *Cancer Lett*. 235: 84-92
42. Foulkes NS, Mellström B, Benusiglio E, Sassone-Corsi P (1992). Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature*. 355(6355): 80-4
43. Foulkes NS, Schlotter F, Pévet P, Sassone-Corsi P (1993). Pituitary hormone FSH directs the CREM functional switch during spermatogenesis. *Nature*. 362(6417): 264-7
44. Chiarini-Garcia H, Russell LD (2001) High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol Reprod*. 65(4):1170-8.
45. Geisinger A, Rodríguez-Casuriaga R (2010). Flow cytometry for gene expression studies in Mammalian spermatogenesis. *Cytogenet Genome Res*. 128(1-3):46-56.
46. Golestaneh N, Kokkinaki M, Pant D, Jiang J, DeStefano D, Fernandez-Bueno C, Rone JD, Haddad BR, Gallicano GI, Dym M (2009). Pluripotent stem cells derived from adult human testes. *Stem Cells Dev*. 18(8):1115-26
47. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med*. 183: 1797–1806
48. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M (1997) Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat. Med*. 3: 1337–1345
49. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2(1):48-58

50. Gray JW (1974) Cell cycle analysis from computer synthesis of deoxyribonucleic acid histograms. *J Histochem Cytochem* 22: 642
51. Greenspan, E. P. Mayer and S. D. Fowler (1985). Nile Red, A Selective Fluorescent Stain for Intracellular Lipid Droplets. *Journal of Cell Biology* 100 (1): 965–973
52. Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*. 440(7088):1199-203.
53. Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD et al (1999). Dystrophin expression in The mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390-394
54. Heller CG, Clermont Y (1963). Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science*. 140(3563):184-6
55. Higgins CF, Hiles ID, Salmond, GPC, Gill DR, Downie JA (1986) A family of related ATP binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* 323: 448-450
56. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF (1990) Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*. 346(6282):362-5
57. Jackson H, Kuglemann N, Springfield IL (1966) Antifertility Compounds in the Male und Female. Pp. 55-79
58. James E. Shima, Derek J. McLean, John R. McCarrey, and Michael D. Griswold (2004) The Murine Testicular Transcriptome: Characterizing Gene Expression in the Testis During the Progression of Spermatogenesis. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 71, 319 –330
59. Janvilisri T, Shahi S, Venter H, Balakrishnan L, van Veen HW (2005) Arginine-482 is not essential for transport of antibiotics, primary bile acids and unconjugated sterols by the human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Biochem. J.* 385: 419–426
60. Juliano RL, Ling VA (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* 455: 152-162
61. Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG, Cowan K (2002) The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res.* 8(1):22-8

62. Kraemer P, Deaven L, Crissman H, Van Dilla M (1972) DNA constancy despite variability in chromosome number. *Adv Cell Mol Biol* 2: 47
63. Krishnamurthy P, Schuetz, JD (2006) Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 381–410
64. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2003) Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(11):6487-92.
65. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004a). Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod.* 71(3):722-31
66. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004b). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(47):16489-94
67. Kubota H, Wu X, Goodyear SM, Avarbock MR, Brinster RL (2011). Glial cell line-derived neurotrophic factor and endothelial cells promote self-renewal of rabbit germ cells with spermatogonial stem cell properties. *FASEB J.* 25(8):2604-14
68. Lalande ME, Miller RG (1979) Fluorescence flow analysis of lymphocyte activation using Hoechst 33342 dye. *J Histochem Cytochem.* 27(1):394-7
69. Lalli M, Clermont Y (1981). Structural changes of the head components of the rat spermatid during late spermiogenesis. *Am J Anat.* 160(4):419-34
70. Lassalle B, Bastos H, Louis JP, Riou L, Testart J, Dutrillaux B, Fouchet P, Allemand I (2004) 'Side Population' cells in adult mouse testis express Bcrp1 gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development* 131: 479-487
71. Latt SA, Wohlleb JC (1975) Optical studies of the interaction of 33258 Hoechst with DNA, chromatin and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 52: 297
72. Leemhuis T, Yoder MC, Grigsby S, Agüero B, Srour EF (1996) Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine123. *Exp. Hematol.* 24: 1215-24
73. Ling V, Neben S (1997). In vitro differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. *Cell Physiol.* 171: 104-115
74. Loe DW, Deeley RG, Cole SP (1998) Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.* 58(22):5130-6

75. Malkov M, Fisher Y, Don J (1998). Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. *Biol Reprod.* 59(1):84-92
76. Mangan JA, Butcher, P.D. (1993) „Running AMOC with Superscript™ II Reverse Transcriptase.“ In: *Focus*, vol 15, pp67-69
77. Manova K, Nocka K, Besmer P, Bachvarova RF (1990) Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development.* 110(4): 1057-69
78. Mao Q (2008) BCRP/ABCG2 in the Placenta: Expression, Function and Regulation. *Pharm Res.* 6:1244-1255
79. Melaine N, Liénard MO, Dorval I, Le Goascogne C, Lejeune H, Jégou B (2002) Multidrug resistance genes and p-glycoprotein in the testis of the rat, mouse, Guinea pig, and human *Biol Reprod.* 67: 1699-1707
80. Miyake K, Mickley L, Litman T, Zhan Z, Robey R (1999) Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes *Cancer Res.* 59: 8–13
81. Mueller M, Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EG, Jansen PL (1994) Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(26):13033-7
82. Mullaney PF, Steinkamp JA, Crissman HA, Cram MS, Holm DM (1974) Laser flow microphotometers for rapid analysis and sorting of individual mammalian cells. *Laser Applications in Medicine and Biology.* Edited by ML Wolbarsht. Plenum Press, New York: 155-204
83. Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
84. Nakagawa R, Hara Y, Arakawa H, Nishimura S, Komatani H (2002) ABCG2 confers resistance to indolocarbazole compounds by ATP-dependent transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 299(4):669-75
85. Oakberg EF (1957). Duration of spermatogenesis in the mouse. *Nature.* Nov 23;180(4595):1137-8
86. Orwig KE, Ryu BY, Master SR, Phillips BT, Mack M, Avarbock MR, Chodosh L, Brinster RL (2008). Genes involved in post-transcriptional regulation are overrepresented in stem/progenitor spermatogonia of cryptorchid mouse testes. *Stem Cells.* 26(4):927-38

87. O'Shaughnessy PJ, Morris ID, Huhtaniemi I, Baker PJ, Abel MH (2009). Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. *Mol Cell Endocrinol.* 306(1-2):2-8.
88. Packer AI, Besmer P, Bachvarova RF (1995). Kit ligand mediates survival of type A spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes. *Mol Reprod Dev.* 42(3): 303-10
89. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett.* 26(6): 509-15
90. Randall TD, Weissmann IL (1998). Characterization of a population of cells in the bone marrow that phenotypically mimics hematopoietic stem cells: resting stem cells or mystery population. *Stem Cells* 16: 38-48
91. Ren D, Navarro B, Perez G, Jackson AC, Hsu S, Shi Q, Tilly JL, Clapham DE (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature.* 413(6856): 603-9
92. Riboldi M, Rubio C, Pellicer A, Gil-Salom M, Simón C (2012). In vitro production of haploid cells after coculture of CD49f+ with Sertoli cells from testicular sperm extraction in nonobstructive azoospermic patients. *Fertil Steril.* 98(3):
93. Robey RW, Polgar O, Deeken J, To KW, Bates SE (2007) ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* 26: 39–57
94. Rodríguez-Casuriaga R, Geisinger A, Santiñaque FF, López-Carro B, Folle GA (2011). High-purity flow sorting of early meocytes based on DNA analysis of guinea pig spermatogenic cells. *Cytometry A.* 79(8):625-34. doi: 10.1002/cyto.a.21067
95. Romrell LJ, Bellvé AR, Fawcett DW (1976) Separation of mouse spermatogenic cells by sedimentation velocity. A morphological characterization. *Dev Biol.* 49(1):119-31
96. Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis.* Vienna, IL: Chache River Press
97. Santen RJ, Bourguignon JP (1987). Gonadotropin-releasing hormone: physiological and therapeutic aspects, agonists and antagonists. *Horm Res.* 28(2-4): 88-103

98. Saraste M, Walker JE (1982) Internal sequence repeats and the path of polypeptide in mitochondrial ADP/ATP translocase. *FEBS Lett.* 144: 250–254
99. Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Nemet K, Varadi A (2004) ABCG2 – a transporter for all seasons. *FEBS Lett* 567: 116–120
100. Sarkadi B, Laszlo H, Gergely S, Varadi A (2006) Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System *Physiol Rev* 86: 1179–1236
101. Sassone-Corsi P (1998). CREM: a master-switch governing male germ cells differentiation and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol.* 9(4): 475-82
102. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B (2002) The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 99: 507–12
103. Scharenberg C, Mannowetz N, Robey RW, Brendel C, Repges P, Sahrhage T, Jähn T, Wennemuth G (2009). ABCG2 is expressed in late spermatogenesis and is associated with the acrosome. *Biochem Biophys Res Commun.* 378(2):302-7.
104. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L (1996). P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest.* 97(11):2517-24
105. Schrans-Stassen BH, van de Kant HJ, de Rooij DG, van Pelt AM (1999). Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated und differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology* 140: 5894-5900
106. Schuetz EG, Schinkel AH (1999). Drug disposition as determined by the interplay between drug-transporting and drug-metabolizing systems. *J Biochem Mol Toxicol.* 13(3-4):219-2
107. Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falciatori I, Kim J, Chavala S, Scherr DS, Zhang F, Torres R, Gale NW, Yancopoulos GD, Murphy A, Valenzuela DM, Hobbs RM, Pandolfi PP, Rafii S (2007). Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature.* 449(7160):346-5
108. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL (1999). beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 5504-5509
109. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL (2000a). Functional analysis of spermatogonial stem cells in Steel and cryptorchid infertile mouse models. *Dev. Reprod.* 220: 401-411



110. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL (2000b). Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18;97(15):8346-51
111. Shinohara T, Ishii K, Kanatsu-Shinohara M (2011). Unstable side population phenotype of mouse spermatogonial stem cells in vitro. *J Reprod Dev.* 57(2):288-95
112. Sorrentino V, Giorgi M, Geremia R, Besmer P, Rossi P (1991). Expression of c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. *Oncogene* 6: 149-151
113. Suzuki M, Suzuki H, Sugimoto Y, Sugiyama Y (2003) ABCG2 transports sulfated conjugates of steroids and xenobiotics. *J. Biol. Chem.* 278: 22644–22649
114. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR (2000). Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques.* 29(2): 332-7
115. Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada W, Arai F, Hirao A, Suda T (2008). Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell-cycle arrest. *Cell Stem Cell.* 2(2):170-82
116. Vincent S, Segretain D, Nishikawa S, Nishikawa SI, Sage J, Cuzin F, Rassoulzadegan M (1998). Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a Kit-KL interaction critical for meiosis. *Development.* 125(22):4585-93
117. Weidner W, Colpi GM, Hargreave TB, Papp GK, Pomerol JM, Ghosh C; EAU Working Group on Male Infertility (2002). EAU guidelines on male infertility. *Eur Urol.* 42(4):313-22
118. Wennemuth G, Westenbroek RE, Xu T, Hille B, Babcock DF (2000). CaV2.2 and CaV2.3 (N- and R-type) Ca<sup>2+</sup> channels in depolarization-evoked entry of Ca<sup>2+</sup> into mouse sperm. *J Biol Chem.* 275(28): 21210-7
119. Wennemuth G, Carlson AE, Harper AJ, Babcock DF (2003). Bicarbonate actions on flagellar and Ca<sup>2+</sup> -channel responses: initial events in sperm activation. *Development.* 130(7): 1317-26
120. Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T (1991). Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development* 113: 689-699
121. Zhang L, Tang J, Haines CJ, Feng HL, Lai L, Teng X, Han Y (2011). c-kit and its related genes in spermatogonial differentiation. *Spermatogenesis.* 1(3):186-194.

122. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J (2001) The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* 7: 1028–1034
123. Zhou S, Morris JJ, Barnes Y, Lan L, Schuetz JD, Sorrentino BP (2002) Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12339–12344

## 7. Anhang

### 7.1. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zusammenfassung bis jetzt bekannter Eigenschaften bei der FACS Untersuchung	20
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Materialien mit Bestellnummer und Herstellerfirmen	24
<b>Tabelle 3:</b> Spezifische Eigenschaften der genutzten Fluorochrome	26
<b>Tabelle 4:</b> Primer für die semiquantitative RT-PCR	26
<b>Tabelle 5:</b> Übersicht der in dieser Arbeit angewandten Methoden zur Erarbeitung der Fragestellung	44
<b>Tabelle 6:</b> Zuordnung der Hodenzellgruppen des Hoechstprofils zu Hodenzellpopulationen der Spermatogenese anhand der Genexpression von ABCG2, c-Kit, CatSper1, CREM- $\tau$ und $\beta$ -actin	63
<b>Tabelle 7:</b> Zuordnung der Hodenzellpopulationen zu Sortierkriterien der FACS-Analyse	67

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Spermatogenese im Hoden	6
<b>Abbildung 2:</b> Hoechst 33342	10
<b>Abbildung 3:</b> Schematisiertes Protokoll	27
<b>Abbildung 4:</b> Schematischer Ablauf einer MACS Zellanreicherung	34
<b>Abbildung 5:</b> Gating, Histogramm und Zytogramm	37
<b>Abbildung 6:</b> Voranalyse der Proben	39
<b>Abbildung 7:</b> Hodenzellen im Hoechstprofil	45
<b>Abbildung 8:</b> MACS-Anreicherung mit Thy-1-beats	47
<b>Abbildung 9:</b> MACS-Anreicherung mit $\alpha$ -6-integrin-beats	49
<b>Abbildung 10:</b> MACS-Anreicherung mit c-Kit-beats	51
<b>Abbildung 11:</b> Sortierkriterien für testikuläre SP-Zellen	53
<b>Abbildung 12:</b> Fluoreszenz der Hoden-SP-Zellen	55
<b>Abbildung 13:</b> FACS-Sort der Gruppe 1 (Spermatogonien A)	56
<b>Abbildung 14:</b> FACS-Sort der Gruppe 2 (Spermatogonien B)	57
<b>Abbildung 15:</b> FACS-Sort der Gruppe 3 (Spermatozyten I)	58
<b>Abbildung 16:</b> FACS-Sort der Gruppe 4 (Spermatozyten II)	59
<b>Abbildung 17:</b> FACS-Sort der Gruppe 5 (Spermatiden)	60
<b>Abbildung 18:</b> FACS-Analyse und Sortierkriterien der Knochenmarkzellen	61
<b>Abbildung 19:</b> ABCG2-Expression	64
<b>Abbildung 20:</b> c-Kit-Expression	65
<b>Abbildung 21:</b> CatSper1-Expression	65
<b>Abbildung 22:</b> CREM-T-Expression	66
<b>Abbildung 23:</b> $\beta$ -actin Expression	66
<b>Abbildung 24:</b> Lokalisation der Hodenzellpopulationen im Hoechstprofil	68

### 7.3. Formelverzeichnis

**Formel 1:** Isolierte Zellen =  $n \times 1000 \times \text{Volumenmenge [ml]}$  30

**Formel 2:** Gesamtvolumen [ml]  $\times 1000 / 200 = \text{Volumen Hoechst 33342 } [\mu\text{l}]$  32

## 7.4. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Adenosin-Triphosphat-Binding-Cassett
ABCC1	ABC-Transporter Familie B Type 1
ABCC1	ABC-Transporter Familie C Type 1
ABCG2	ABC-Transporter Familie C Type 2
ABCP	ABC-Transporter Familie P
ACK2	anti-c-Kit-Antikörper
Actb	$\beta$ -actin
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AMOC	Arithmetic multiplication of cDNA
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Breast-Cancer-Resistance-Protein
BL	Basal Lamin
BM-SP	Knochenmarkzellen aus der SP-Region
BM-nSP	Knochenmarkzellen nicht aus der SP-Region
bp	Basenpaar
BSA	Bovinen-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
C57BL/6	C57 black/6
ca.	circa
Ca	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat
CatSper	Cation channel of Sperm-Gen
CatSper -/-	CatSper- Gen wird nicht exprimiert
CaV	Calcium-Voltage Dependent
CD 45	Cluster of Differentiation 45
CD 34+	Cluster of Differentiation 34 positiv
CD 49f	Cluster of Differentiation 49f
CD 90.2	Cluster of Differentiation 90.2
CD 117	Cluster of Differentiation 117

cDNA	komplementäre DANN
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
CREM	cAMP-responsive Element Modulator
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetrasäure
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FSC	Forward Scatter
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
G	G unit gravity (Erdbeschleunigung)
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
hi	high
HKG	Housekeeping Gen
HSC	hämatopoetische Stammzelle
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermien Injektion
KV	Kalium-Voltage-Dependent
lo	low
MACS	Magnetic Cell Sorting
MDR	Multi-Drug-Resistance-Protein
MHC I <sup>-</sup>	Major Histocompatibility Complex I negativ
MP	Main Population
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRP	Multi-Drug-Resistance-associated-Protein
MXR	Mitoxantron-Resistance-Transporter
NBS	Nukleotidbindungsstelle
neg	negativ
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
pos	positiv
Rpm	Radiations per Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion

---

SP	Side Population
SP+	Side Population positiv
SC I /Spermatozyten I	Spermatozyten erster Ordnung
SC II /Spermatozyten II	Spermatozyten zweiter Ordnung
SSC	Side Scatter
ST	Spermatiden
Sycp 1	Synaptonemal complex protein
Thy-1	Thymocyte differentiation antigen 1
TMD	Transmembrandomane
TSC	testikuläre Stammzellen
Type A	Spermatogonien A
Type B	Spermatogonien B
z. B.	zum Beispiel



## 8. Publikation

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Biochemical and Biophysical Research Communications 378: 302-307, 9 Januar 2009

### **ABCG2 is expressed in late spermatogenesis and associated with the outer acrosomal membran**

Christian Scharenberg, Nadja Mannowetz, Robert W. Robey, Cornelia Brendel, Philip Reppes, Tim Sahrhage, Thomas Jähn, Gunther Wennemuth

## 9. Danksagung

Vielen herzlichen Dank an alle Menschen, die mir den Abschluss dieser Dissertation ermöglichten haben.

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater und Freund Gunther Wennemuth für das spannende Thema und die interessante Aufgabenstellung bedanken. Seine unendliche Geduld, aufbauenden Worte und freundschaftliche Unterstützung haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank für alle Ratschläge, die für mich stets Inspiration und Motivation waren.

Besonderer Dank gilt natürlich auch meinem Betreuer Christian Scharenberg mit dem ich viele unvergessliche Stunden im Labor verbracht habe und in dem ich einen tollen Freund gewonnen habe. Vielen Dank für die Einarbeitung in die Materialien und Methoden und für die langjährige Unterstützung.

Ebenso möchte ich Elke Völk-Badouin einen großen Dank für die Besondere Hilfestellung aussprechen. Außerdem gilt den Mitarbeitern der Abteilung für Anatomie und Zellbiologie der Universitäten Marburg und Homburg ein großer Dank für die herzliche Unterstützung.

Insbesondere gilt meinen Eltern ein besonders großer Dank. Sie haben mir eine unvergessliche und sorgenlose Studienzeit ermöglicht, waren immer für mich mit Rat und Tat zur Stelle und haben mich stets unterstützen und zu motivieren.

Nicht zuletzt gilt ein sehr großer Dank meiner geliebten Frau Johanna. Sie hat sich trotz beruflicher Belastung die Mühe gemacht mich zu unterstützen und zu motivieren. Ihr andauernder Antrieb gab mir immer wieder aufs Neue Kraft diese Dissertation zum Abschluss zu bringen.

Vielen Dank Euch allen!